

فصل اول

مقدمہ

۱-۱ بیان مسأله

گونه های انتروباکتر از اعضای خانواده انتروباکتریاسه به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند. گزارشات مختلفی از سراسر جهان مبنی بر نقش این ارگانیزم ها در ایجاد عفونت های جدی و مهم از جمله عفونت های دستگاه ادراری، دستگاه تنفس، پوست، بافت نرم و خون در بخش های مختلف بیمارستانی بویژه بخش مراقبت ویژه (ICU) وجود دارد (۱).

مجموعه داروهای بتالاکتام یکی از فراوان ترین و پرمصرف ترین داروهای تجویزی علیه این میکروارگانیزم ها هستند که در سال های اخیر پیدایش گونه های مقاوم دارویی این ارگانیزم ها نگرانی های زیادی را برای پزشکان جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب در پروسه درمانی ایجاد کرده است (۲). عمده این نگرانی ها به سبب پیدایش مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام از طریق حضور تیپ های عمده بتالاکتامازها از جمله بتالاکتامازهای وسیع الطیف^۱ (ESBLs) می باشد (۳).

تا کنون انواع مختلفی از آنزیم های بتالاکتاماز در گونه های انتروباکتر شناسایی شده اند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) آنزیم های کد شونده پلاسمیدی هستند که توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام از جمله پنی سیلین و نسل یک، دو و سه سفالوسپورین ها را دارند. بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ های CTX-M،SHV،TEM از فراوان ترین آنزیم های دخیل در بروز این تیپ از

¹ Extended Spectrum Beta-Lactamases

مقاومت می باشند. در عین حال تیپ های دیگر از این آنزیم ها از جمله OXA، PER،VEB نیز در مطالعات اخیر گزارش شده اند(۴).

اگزاسیلین بتالاكتامازها در طبقه بندی آمبلر که اساس آن را سکانس های آمینواسیدی تشکیل می داد متعلق به کلاس D بوده و در جایگاه فعال خود دارای سرین می باشند. این دسته از بتالاكتامازها نسبت به آمینوپنی سیلین و یوریدوپنی سیلین مقاوم هستند و دارای فعالیت هیدرولیز کنندگی بالایی علیه اگزاسیلین ، کلوگزاسیلین و متی سیلین بوده در حالیکه به طور نسبتاً "ضعیفی توسط اسید کلاولانیک مهار می شوند . در طبقه بندی دیگری که توسط کارن بوش در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و اساس این طبقه بندی توانایی این آنزیم ها در هیدرولیز کلاسهای خاصی از داوهای بتالاكتام و غیر فعال شدن توسط مهارکننده هایی همچون اسید کلاولانیک، سولباکتام و تازوباكتام بود، بتالاكتامازها در ۴ گروه قرار گرفتند. اگزاسیلین بتالاكتامازها به این ترتیب در گروه ۲ و در زیرگروه ۲d قرار گرفتند(۵). بر همین اساس یعنی فعالیت هیدرولیز کنندگی بالا علیه اگزاسیلین و کلوگزاسیلین و مهارشوندگی ضعیف توسط اسید کلاولانیک به ۵ گروه تقسیم می شوند. بر این اساس گروه ۱ شامل (5-7-10-13) OXA، گروه ۲ شامل (15-20-2-3) OXA و گروه ۳ شامل (1-4-30-31)، گروه ۴ شامل (OXA-9) و گروه ۵ شامل LCR می باشد(۶).

مطالعات اخیر نشان داده اند که پلاسمید های حاوی ژن های کد کننده Extended spectrum beta-lactamase می توانند همزمان ژن های کد کننده مقاومت به سایر آنتی بیوتیک ها از جمله کینولون ها را نیز با خود حمل می کنند که باعث پیدایش گونه های انتروباکتر با مقاومت چند گانه

(Multidrug resistant *Enterobacter spp*) می شوند که مقدمات محدودیت های درمانی و

مشکلات فراوان در ریشه کنی این ارگانیسم ها در بیمارستان را ایجاد کرده است (۷).

لذا انتخاب آنتی بیوتیک های مناسب برای درمان و اعمال راهکارهای مناسب کنترل عفونت در بیمارستان ها، شناسایی وضعیت الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این ارگانیسم نسبت به آنتی بیوتیکهای پیشنهادی CLSI^۲ و همچنین بررسی ویژگیهای ژن های کد کننده فاکتورهای مقاومت دارویی ضروری می باشد (۸).

هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ایزوله های انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف ژنوتیپ های OXA از مجموعه ژنهای بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در بیمارستان های شهرهای قزوین، تهران و کرج است.

² Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI

۲-۱ تاریخچه

جنس انتروباکتر اولین بار توسط Hormaeche و Edwards در سال ۱۹۶۰ شناسایی شد. باسیلوس لاکتیس آئروجنز توسط ارلیش در سال ۱۸۸۵ از شیر جدا شد و توسط Kruse در سال ۱۹۸۶ به باسیلوس آئروجنز و توسط Beijerinck در سال ۱۹۰۰ به آئروباکتر آئروجنز تغییر نام پیدا کرد. تا سال ۱۹۵۵ تفاوت این ارگانیزم از باسیل فریدلاندر مشخص نبود و اکثر نویسندگان باسیلوس لاکتیس آئروجنز یا آئروباکتر آئروجنز را حاوی گونه‌های متحرک و غیرمتحرک در نظر می‌گرفتند، تا اینکه Edwards و Fife (در سال ۱۹۵۵) بیان کردند که در حقیقت گونه های *A. aerogenes* همان گونه های کلبسیلا می باشند. باکتریوم کلوآکه در سال ۱۹۸۰ توسط Jordan توصیف شد و به جنس جدید کلوآکه منتقل گردید و توسط Costellina و Chalmers کلوآکه کلوآکه نامیده شد. در اولین ویرایش Bergay's Manual این گونه با عنوان آئروباکتر کلوآکه به جنس آئروباکتر منتقل شد. در سال ۱۹۵۵ Moller تست‌های ساده‌ای را برای دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه معرفی کرد. در حالی که گروه کلوآکه آرژنین مثبت بود، به راحتی می‌توانست از کلبسیلا که آرژنین منفی بود افتراق داده شود. این مسأله منجر به شناسایی گونه‌های متحرکی از گروه کلوآکه شد که آرژنین منفی بودند و از اینوزیتول و گلیسرول تولید گاز می‌کردند. این گونه‌ها کلوآکه B نامیده شدند. سرانجام پس از انجام کشت و تست دکربوکسیلاز، Hormaeche و Edwards در سال ۱۹۵۸ جنس آئروباکتر را دوباره تعریف کردند که شامل دو گونه به نام آئروباکتر آئروجنز (کلوآکه B) و آئروباکتر کلوآکه (کلوآکه A) بود. آنها برای جلوگیری از ابهام ناشی از طبقه بندی مجدد در گونه‌های غیرمتحرک جنس کلبسیلا که

قبلاً آئروباکتر آئروجنز نامیده می‌شدند، جنس جدید انتروباکتر را به‌عنوان جایگزینی برای آئروباکتر در نظر گرفتند که شامل دو جنس انتروباکتر کلواکه و انتروباکتر آئروجنز بود. سایر گونه‌ها که اکنون در جنس انتروباکتر طبقه‌بندی می‌شوند بعد از هیبریداسیون DNA توصیف شدند (۹).

۳-۱ طبقه‌بندی

انتروباکتر یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که گونه‌های جنس انتروباکتر بر اساس هیبریدسازی DNA-DNA شامل موارد زیر می‌باشد (۱۰ و ۱۱).

Domain: Bacteria

Phylum: Protobacteria

Class: Gamma Protobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Enterobacter*

Species: *E. cloacae complex*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans complex*, *E. sakazakii*, *E. intermedium*, *E. amnigenus*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter dissolvens*, *E. nimipressuralis*

۴-۱ خصوصیات عمومی

گونه‌های انتروباکتر از اعضای خانواده انتروباکتریاسه هستند. این ارگانیسم‌ها، باسیل‌های گرم منفی هوازی-بی‌هوازی اختیاری به قطر $0/6$ تا 1 میکرون، دارای حرکت به واسطه فلاژن و پیلی کلاس ۱ هستند. آنها توانایی تولید اسید از تخمیر گلوکز را داشته و متیل رد منفی و وگس پروسکائر مثبت هستند. اپتیمم رشد آنها در دمای 30 درجه بوده و 80 درصد آنها دارای کپسول هستند (۱۲).

گونه‌های انتروباکتر به علت کلونی‌های بزرگ موکوئیدی شبیه به گونه‌های کلبسیلا هستند، اما با تعداد کمی از تست‌ها مثل حرکت و اوره‌آز از هم افتراق داده می‌شوند. انتروباکتر به علت داشتن تحرک، فعالیت اوره‌آز منفی و همینطور فعالیت اورنیتین دکربوکسیلازی مثبت به راحتی از کلبسیلا متمایز می‌شود (۱۳).

اگرچه حرکت یک وجه تشخیصی مهم بین انتروباکتر و کلبسیلا محسوب می‌شود، اما برخی از گونه‌ها مثل انتروباکتر آبسوریا، انتروباکتر دی سولورس، انتروباکتر نیمی پرسورالیس فاقد حرکت بوده و برخی از گونه‌ها مانند انتروباکتر گرگوویا، انتروباکتر هورمچی، انتروباکتر اینترمیدیوس و انتروباکتر پرینوس دارای حرکت متغیر هستند (۱۴).

اکثر گونه‌های انتروباکتر توانایی تخمیر گلوکز و تولید گاز، تخمیر آرابینوز، سلوبیوز، مالتوز، مانیتول، مانوز، رامنوز (به جز آسبوریا)، ترهالوز و گزیلوز (به جز پرینوس) را دارند. همه گونه‌ها قادر به احیای نیترات به نیتريت بوده اما توانایی تولید اندول را ندارند. تولید هیدروژن دی سولفید، هیدرولیز

ژلاتین، تولید لیپاز ، دزوکسی ریبو نوکلئاز و اکسیداز در آنها منفی است. تمام گونه‌ها به جز انتروباکتر ساکازاکی که تولید پیگمان زرد می‌نماید، فاقد پیگمان هستند. میزان سیتوزین و گوانین اسید نوکلئیک در آنها ۵۲ تا ۶۰ درصد است (۱۳).

جنس انتروباکتر از گونه‌های متعددی تشکیل شده که لیست آنها به همراه خصوصیات مربوطه در جدول (۱) آمده است (۱۴).

جدول ۱: تست‌های بیوشیمیایی افتراقی گونه‌های جنس انتروباکتر (۱۳)

Organism	Indole production	Methyl red	Voges-Proskauer	Citrate (Simmons)	Hydrogen sulfide (TSI)	Urea hydrolysis	Phenylalanine deaminase	Lysine decarboxylase	Arginine dihydrolase	Ornithine decarboxylase	Motility	Gelatin hydrolysis (22° C)	Growth in KCN	Malonate utilization	D-Glucose, acid	D-Glucose, gas	Lactose fermentation	Sucrose fermentation	D-Mannitol fermentation	Dulcitol fermentation	Salicin fermentation	Adonitol fermentation
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	98	95	100	100	95	100	100	5	100	98
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup 1	0	7	100	70	0	0	0	0	9	55	92	0	100	91	100	100	70	100	100	0	91	0
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup 2	0	65	100	100	0	0	0	0	35	100	100	0	100	100	100	100	35	0	100	0	100	0
<i>Enterobacter asburiae</i>	0	100	2	100	0	60	0	0	21	95	0	0	97	3	100	95	75	100	100	0	100	0

۵-۱ جایگاه و اهمیت

این ارگانیسم‌ها در آب، خاک، فاضلاب، محصولات لبنی و سبزیجات وجود دارند و قسمتی از فلور روده بوده و به‌طور معمول بیماری‌زا نیستند. اگرچه انتروباکتر به‌ندرت در افراد سالم ایجاد عفونت می‌کند، اما آنها می‌توانند عامل مهم مرگ‌ومیر و بیماری در افراد با نقص ایمنی باشند. انتروباکتر مانند سایر باکتری‌های گرم منفی همانند اشرشیاکولی و سالمونلا، اندوتوکسینی تولید می‌کند که باعث التهاب می‌شود. علائم عفونت‌های انتروباکتر اختصاصی نبوده و در سایر باکتری‌های گرم منفی هم وجود دارد. دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری، شایع‌ترین مکان عفونت انتروباکتر هستند (۱۵).

گونه‌های انتروباکتر می‌توانند عامل عفونت‌های متعددی شامل آبسه‌های مغزی، پنومونی، مننژیت، سپتی‌سمی، زخم، عفونت‌های دستگاه ادراری و حفره روده‌ای- شکمی باشند. آنها همچنین در عفونت‌های مرتبط با ابزار اینتراوسکولار و عفونت‌های ناحیه جراحی نیز مهم هستند. بسیاری از گونه‌های انتروباکتر همچون انتروباکتر ساکازاکی می‌توانند عامل عفونت‌های خارج روده‌ای مثل آبسه‌های مغزی در نوزادان و مننژیت باشند (۱۶).

۶-۱ فاکتورهای بیماریزایی

۱-۶-۱ **هماگلوتینین حساس به مانوز:** هماگلوتینین حساس به مانوز (MS-HA)^۳ تولید می‌کنند

که در فیمبریه تیپ یک واقع شده است. هفت مورد از هشت انتروباکتر ژرژوویه دارای

هماگلوتینین مقاوم به مانوز شبیه هماگلوتینین کلبسیلا (MR/K-HA)^۴ بودند که در فیمبریه

تیپ سه قرار دارد. شش مورد از هشت انتروباکتر ایتترمدیوم قادر به تولید MS-HA یا

MR/K-HA و یا هر دو مورد بودند که مرتبط با فیمبریه تیپ یک هستند. همه انتروباکتر

آئروزنهای که مورد مطالعه قرار گرفتند قادر به تولید هماگلوتینین بودند، بیشتر گونه‌ها

هماگلوتینین حساس به مانوز تولید می‌کنند که به نظر می‌رسد با فیمبریه نازک و فاقد شیار یا

کانال مرتبط باشند. این فیمبریه نازک از لحاظ ژنتیکی با فیمبریه نازک سایر گونه‌های

انتروباکتر و کلبسیلا متفاوت است. همچنین اکثر گونه‌ها قادر به تولید هماگلوتینین غیر

فیمبریه‌ای مقاوم به مانوز شبیه پروتئوس (MR/P-HA)^۵ هستند که توانایی آگلوتینه کردن

گلبول‌های قرمز خوکچه هندی و اسب را دارند.

۲-۶-۱ **هیستامین دکربوکسیلاز:** مسئول شکل‌گیری هیستامین از هیستیدین در محصولات

غذایی است، بنابراین گاهی هیستامین باعث مسمومیت در انسان می‌شود. هیستیدین

دکربوکسیلاز از انتروباکتر آئروزنز خالص سازی و جداسازی شده است.

^۳ هماگلوتینین حساس به مانوز: MS-HA.

^۴ هماگلوتینین مقاوم به مانوز شبیه هماگلوتینین کلبسیلا: MR/K-HA.

^۵ هماگلوتینین غیر فیمبریه‌ای مقاوم به مانوز شبیه پروتئوس: MR/P-HA.

۳-۶-۱ **سیدروفور:** آهن برای رشد باکتری ضروری است. در بدن انسان آهن به صورت کمپلکس

با مولکول‌های حامل مثل ترانسفرین سرم، یا لاکتوفرین در شیر و سایر ترشحات، و در داخل

سلول همراه با پروتئین هم حضور دارد. رشد باکتری در شرایط آهن محدود به این صورت

است که باکتری پاتوژن انتروباکتریاسه دارای سیستمی با افینیتی بالا به نام سیدروفور تولید

می‌کند که قادر است آهن را محلول و وارد سلول کند. همه گونه‌های انتروباکتر کلوآکه،

ژرژوویه، ساکازاکی و آگلومرانس توسط Reissbort و Rabsch در سال ۱۹۸۸ مورد

بررسی قرار گرفتند که همگی قادر به تولید انتروچیلین (سیدروفور انتروباکتر) بودند.

۴-۶-۱ **لیپوساکارید:** در انتروباکتر آگلومرانس لیپوساکاریدی وجود دارد که به لیپیدهای سطحی

سلول‌های ریوی متصل می‌شود. این اتصال در ریه ممکن است باعث ایجاد تغییراتی در

خواص فیزیولوژیکی سورفکتانت‌ها شود و ممکن است مکانیسمی برای پاتوژنیسیته آن باشد

و بیماری تنفسی شغلی ناشی از استنشاق گرد و غبار پنبه ایجاد کند (۹).

از فاکتورهای ویرولانسی گونه های انتروباکتر می توان به همولایزین، پروتئاز خارج سلولی،

کپسول پلی ساکاریدی، سیدوفور، فاکتور کلونیزاسیون تیپ ۱ و ۲ که مسئول اتصال باکتری به

گیرنده های کربوهیدراتی سلول های روده کوچک هستند و فاکتور کلونیزاسیون تیپ ۳ که عامل

کلونیزاسیون در سطوح وسایل مثل کاتترهای ادراری اشاره کرد.

انتروباکتر درگیر در عفونت‌های خارج روده‌ای توانایی اتصال و تهاجم به سلول‌های یوکاریوتی و فضای خارج روده‌ای را داشته و دارای توانایی شلاته کردن آهن برای زنده ماندن و گسترش درون میزبان هستند (۱۷).

۷-۱ نحوه گسترش عفونت انتروباکتر

عفونت انتروباکتر از طریق تماس با افراد آلوده، سطوح آلوده و تجهیزات پزشکی و از طریق دستان پرسنل پزشکی گسترش پیدا می‌کند (۱۵).

۸-۱ دوز عفونی

شواهد تجربی یا اپیدمیولوژیکی از دوز عفونی گونه‌های انتروباکتر وجود ندارند با این حال هزار سلول، عفونی در نظر گرفته می‌شوند که مشابه با دوز عفونی باکتری‌های بیماری‌زای نیسریامنتریتیدیس، اشرشیاکلی O₁₅₇ و تیپ 4b لیستریا مونوسیتوزنز است (۱۸).

۹-۱ فاکتورهای خطر

بیماران بستری در بیمارستان برای مدت طولانی به‌خصوص در بخش آی.سی.یو، حساس‌ترین افراد به عفونت ناشی از انتروباکتر هستند. بیماران زیر دو سال و بالای ۶۵ سال به عفونت حساس هستند. سایر فاکتورهای خطر شامل استفاده قبلی از عوامل ضد میکروبی، بیماری زمینه‌ای، زخم‌های دستگاه

گوارش فوقانی، وجود کاتتر اینترانوس (درون رگی)، شرایط بحرانی مثل سوختگی و نقص ایمنی هستند (۱۵).

فاکتورهای خطر باکتریی ناشی از انتروباکتر در جوانان و کودکان به خصوص در نوزادان متفاوت است. در نوزادان نقص ایمنی به هر علت، سنین بارداری، کاهش وزن در حین تولد، استفاده از وسایل تهاجمی و داروهای ضد میکروبی با افزایش خطر باکتریی انتروباکتر مرتبط است (۱۹).

۱۰-۱ بیماریزایی

گونه‌های انتروباکتر تا سال ۱۹۷۰ به عنوان عفونت‌های بیمارستانی مطرح نبودند، با این حال در دهه‌های اخیر، باکتریی انتروباکتر اکتسابی از بیمارستان به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه در حال افزایش گزارش شده است. باکتریی ناشی از گونه‌های جنس انتروباکتر ۱/۳ تا ۲/۵ برابر در مردان، نوزادان و سالمندان شایع‌تر بوده و میزان مرگ و میر در تمام سنین ۲۰-۳۵ درصد گزارش شده است (۱۹).

گونه‌های انتروباکتر به خصوص انتروباکتر آئروجنز و انتروباکتر کلواکه با عفونت‌های بیمارستانی مرتبط بوده و پاتوژن فرصت طلب در نظر گرفته می‌شوند و به ترتیب مسئول ۶۵/۷۵ درصد و ۱۵/۲۵ درصد عفونت‌های انتروباکتر هستند. گونه‌های انتروباکتر به طور عمده در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) یافت شده و مسئول ۸/۶ درصد عفونت‌های بیمارستانی براساس گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) است. گونه‌های انتروباکتر نسبت قابل توجهی از موارد باکتریی

گزارش شده را نیز دربرمی گیرند. در یک بیمارستان نوزادان گونه‌های انتروباکتر مسئول ۱۴ درصد موارد باکتری می هستند، درحالی که در بالغین ۱/۵ تا ۶ درصد موارد باکتری می را تشکیل می دهند.

از دهه ۱۹۷۰ تا ۱۹۷۱ یک اپیدمی از سپتی سمی به علت آلوده شدن محصولات IV وجود داشت که ۳۷۸ بیمار در ایالات متحده را درگیر کرد (۲۰).

۱۱-۱ گونه‌های مهم از نظر بالینی

۱۴ گونه یا بیوگروه جنس انتروباکتر در جدید ترین نسخه کتاب Manual Of Clinical Microbiology ذکر شده است. البته آن ها به عنوان علل بیماری در انسان شناخته نشده اند (۲۱).

گونه‌های مهم که از نمونه‌های بالینی جدا می شوند شامل انتروباکتر کلوآکه، انتروباکتر آئروجنز، انتروباکتر ژرژوویه و انتروباکتر هورمچی و ساکازاکی هستند (۱۳).

۱-۱۱-۱ انتروباکتر کلوآکه

یکی از شایع ترین گونه‌های انتروباکتر متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و یک عامل عفونت در بیماران بستری و ناتوان بوده و به عنوان یک پاتوژن باکتریایی مهم در سال‌های اخیر گسترش یافته است.

عفونت خون ناشی از انتروباکتر کلوآکه، یک عامل مهم بیماری و مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است (۲۲). انتروباکتر کلوآکه یک پاتوژن نوزادی در حال گسترش می باشد که مسئول عفونت‌های تهاجمی گوناگون شامل باکتری می، عفونت‌های دستگاه تنفسی، اندوکاردیت است

و با مرگ و میر شدید در ارتباط است. در مطالعه‌ای که توسط Antony و همکارانش انجام شد، انتروباکتر کلواکه جدا شده از ۱۸ نوزاد، منجر به مرگ ۸ نوزاد گردید (۲۳).

عفونت ناشی از انتروباکتر کلواکه به‌طور شایعی در میان قربانیان سوختگی، بیماران با نقص ایمنی و بیماران با بدخیمی مشاهده شده است. سیستم‌های ریوی و ادراری، شایع‌ترین ارگان‌های کلونیزه شده با این ارگانیسم در این بیماران است. باکتری می با انتروباکتر کلواکه همچنین بستگی به شدت و گسترش نقص ایمنی هم دارد (۲۴).

۲-۱۱-۱ انتروباکتر آئروجنز

به‌عنوان یک عامل پاتوژن مهم بیمارستانی از سال ۱۹۹۲ گسترش یافته است. این باکتری گرم منفی اکنون سومین عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دستگاه تنفسی در میان باکتری‌های گرم منفی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا است (۲۵).

۳-۱۱-۱ انتروباکتر ساکازاکی

از محیط‌های مختلف مثل خاک، شیر خشک، شکلات و از غذاهای مختلف مثل پنیر، گوشت و سبزیجات جدا می‌شود (۲۶). تولید پیگمان یک شاخص مهم انتروباکتر ساکازاکی است (در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بهتر تولید می‌شود) که تا حد زیادی در دمای معمولی انکوباسیون (۳۷ درجه سانتی گراد) تولید آن کاهش می‌یابد، به همین دلیل آن را انتروباکتر کلواکه تولید کننده پیگمان زرد نامیدند (۲۷). انتروباکتر ساکازاکی یک باسیل گرم منفی، عامل عفونت خون و سیستم عصبی است و

همچنین با انتروکولیت نکروز دهنده مرتبط است (۲۸). انتروباکتر ساکازاکی، خطر مهمی برای سلامت نوزادان شمرده می‌شود. این باکتری یک پاتوژن فرصت طلب در حال گسترش است که نادر بوده اما مواردی از مننژیت تهدید کننده زندگی، اندوکاردیت نکروز دهنده و سپسیس در نوزادان کامل و نارس را دربر می‌گیرد (۲۹).

۴-۱۱-۱ انتروباکتر هارمچئی

توسط O Hara و همکارانش از نمونه زخم، خلط و خون در سال ۱۹۸۹ جدا شد. این باکتری یک گونه از ۶ گونه قرار گرفته در کمپلکس انتروباکتر کلواکه است (۳۰).

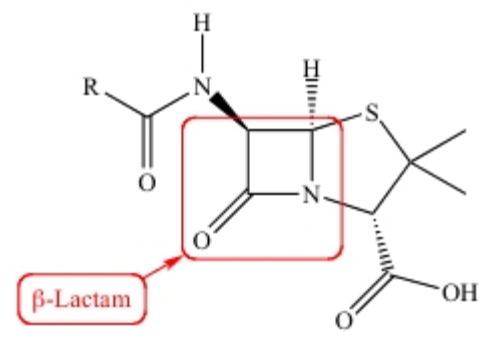
۵-۱۱-۱ انتروباکتر ژرژوویه

توسط ریچارد و همکارانش در منابع طبیعی گوناگون مثل آب شناسایی شد (۹).

۱۲-۱ آنتی بیوتیک های بتالاکتام

نام آنتی بیوتیک های بتالاکتام به علت وجود حلقه بتالاکتام که در واقع ناحیه فعال آنتی بیوتیک است، می‌باشد. حلقه بتالاکتام به علت شباهتی که به آسیل - D - آلانین - D - آلانین دارد به طور محکم به ناحیه فعال آنزیم های ترانس پپتیداز اتصال می‌یابد. این عمل آنزیم کاتالیز کردن عمل ترانس پپتیداسیون N - استیل مورامیک اسید در میان لایه های دیواره سلولی می‌باشد. اهمیت ترانس

پتیداسیون به دلیل کامل کردن پیوندهای متقاطع در لایه مورینی که قدرت کشش لازم برای مقاومت در برابر لیز اسمزی را فراهم می‌کند، می‌باشد.



شکل ۱: ساختار حلقه بتالاکتام (۳۱)

آنزیم‌هایی که به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام اتصال می‌یابند به عنوان پروتئین‌های اتصال یابنده به پنی سیلین (PBPs) شناخته می‌شوند، چرا که این آنزیم‌ها در ابتدا به وسیله خاصیت ترکیب شدن با پنی سیلین شناسایی شده‌اند. PBP ها گروه‌های متنوعی از ترانس پتیدازها هستند که هر کدام در جنبه‌های مختلف سنتز دیواره سلولی درگیر هستند. هر آنتی بیوتیک بتالاکتام ترجیحا به یک PBPs خاص اتصال می‌یابند. لذا نوع و مقدار PBPs ها حساسیت و یا مقاومت باکتری به انواع خاصی از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را تعیین خواهد کرد. چهار گروه از آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در زیر بحث شده است:

۱-۱۲-۱ پنی سیلین‌های طبیعی: پنی سیلین G و V که جز پنی سیلین‌های طبیعی هستند.

۱-۱۲-۱ پنی سیلین G: پنی سیلین در سال ۱۹۲۹ توسط الکساندر فلمینگ کشف و بعداً

توسط H.W.Florey و E.B.Chain کامل و گسترش یافت. هسته آن دارای

ساختار دوحلقه‌ای شامل حلقه تiazolidine و حلقه بتالاکتام و اسید فنیا استیک

است که به حلقه بتالاکتام توسط پیوند پپتیدی اتصال یافته است. جایگاه فعال پنی

سیلین، حلقه بتالاکتام آن است. وقتی که یک مولکول پنی سیلین با یک PBP

مواجه می‌شود، بین باند CO و N در حلقه بتالاکتام شکاف ایجاد شده و ترانس

پپتیداز به وسیله پیوند کووالانته به CO متصل می‌شود. این باعث می‌شود که

ترانس پپتیداز برای سنتز پپتیدگلیکان در دسترس نباشد و پیوند پپتیدی متقاطع

ایجاد نشود. تجمع پیش سازهای بدون پیوند پپتیدی پپتیدوگلیکان، سبب فعال

شدن بیشتر آنزیم‌های اتولیتیک شده و همراه با کمبود پیوند متقاطع و فعالیت

اتولیزی افزایش یافته، باکتری‌ها به لحاظ اسموتیکی شکننده می‌شوند.

پنی سیلین G به‌طور اولیه برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت مانند پنوموکوک،

استافیلوکوک و استرپتوکوک استفاده می‌شود. همچنین برای درمان عفونت‌های ایجاد شده به وسیله

نایسریا گنوره و نایسریا مننژیتیدیس که گرم منفی هستند نیز کاربرد دارد

۱-۱۲-۲ پنی سیلین V: در طول دهه ۱۹۵۰ محققان دریافته‌اند که انواع پنی سیلین تولید

شده توسط پنی سیلیوم با تغییر ساختار انواع محیط کشت، تغییر پیدا می‌کنند. با

تهیه محیط کشتی همراه با اسیدهای آلی گوناگون، آنها قادر به تولید انواع مختلف

پنی سیلین خواهند بود. درحالی که پنی سیلین G توسط محیط‌های حاوی فنیل استیک اسید تولید می‌شود، پنی سیلین V توسط محیط‌های حاوی ارائه دهنده فنوکسی متیل تولید می‌شود. پنی سیلین V نماینده یک پیشرفت بزرگ است، زیرا نسبت به پنی سیلین G به اسید معده بسیار مقاوم است. بنابراین برخلاف پنی سیلین G که مجبور به استفاده تزریقی می‌باشیم پنی سیلین V را می‌توان خوراکی نیز تجویز کرد. امروزه پنی سیلین V به‌طور گسترده‌ای در بیماری‌های کودکان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲-۱۲-۱ پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک و آنالوگ: سه گروه پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک

متعاقبا گسترش یافته‌اند؛ پنی سیلین‌های مقاوم به پنی سیلیاز، پنی سیلین‌های با طیف وسیع و پنی سیلین‌های ضد سودوموناس.

۱-۲-۱۲-۱ پنی سیلین‌های مقاوم به پنی سیلیناز: جهت درمان سوش‌های استافیلوکوکی

که به پنی سیلین G مقاوم هستند، یک سری از پنی سیلین‌های مقاوم به پنی سیلیناز طراحی شده‌اند. این آنتی بیوتیک‌ها شامل متی سیلین، نافسیلین و پنی سیلین‌های ایزوکسازولیل (اکساسیلین و کلوکساسیلین و دی کلوکساسیلین و فلوکساسیلین) هستند. این پنی سیلین‌ها بسیار سمی‌تر و فعالیتی کمتر از پنی سیلین G دارند، اما آنها در برابر هیدرولیز با بتالاکتامازهای استافیلوکوکی از خود مقاومت نشان می‌دهند. اگرچه متی سیلین تکیه گاه اصلی جهت درمان

استافیلوکوکی است، اما استفاده از آن با گسترش حضور استافیلوکوکی اورئوس

مقاوم به متی سیلین کاهش می‌یابد.

۱-۱۲-۲ پنی سیلین‌های با طیف وسیع: دومین گروه پنی سیلین‌های نیمه سنتتیک به

صورت پنی سیلین‌هایی هستند که بر باکتری‌های گرم منفی نیز مؤثرند. این گروه

شامل آمینوپنی سیلین (آمپی سیلین، آموکسی سیلین و بکامپی سیلین) و

آمدینوسیلین (پومسیلینام) هستند.

آمینو پنی سیلین‌ها علیه بسیاری از باکتری‌های گرم منفی مؤثر بوده و تقریباً بر یک دوم باکتری‌های

گرم مثبت حساس به پنی سیلین G مؤثر هستند. گروه آمینو به آنها اجازه عبور از شارژ منفی غشا

خارجی باکتری‌های گرم منفی را می‌دهند، لذا جز پنی سیلین‌های با طیف بسیار وسیع هستند.

همچنین آنها در مقابل اسیدیته پایدار بوده و به حالت خوراکی می‌توان آنها را تجویز کرد.

محدودیت‌های اساسی این آنتی بیوتیک‌ها، هیدرولیز آسان آنها در مقابل بتالاکتامازها و مؤثر نبودن

علیه سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. آمینو پنی سیلین‌ها علیه سویه‌های اشرشیاکلی، هموفیلوس

آنفلوانزا، پروتئوس، سالمونلا و شیگلا که توان تولید بتالاکتامازها را ندارند، مؤثر می‌باشند.

۱-۱۲-۳ پنی سیلین‌های ضد سودوموناسی: سه نوع پنی سیلین جهت از بین بردن

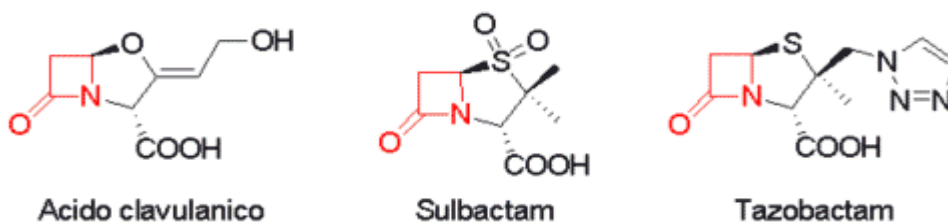
سودوموناس آئروژینوزا ظهور یافته‌اند که عبارتند از: کربوکسی پنی سیلین‌ها، پنی

سیلین‌های پپرازین و اوریدو پنی سیلین‌ها.

کاربنی سیلین و تیکارسیلین که جز کربوکسی پنی سیلین‌ها هستند، اولین پنی سیلین‌های ضد سودوموناس بوده‌اند. آنها علیه باکتری‌های گرم مثبت مؤثر نبوده ولی فعالیت شدیدی علیه باسیل‌های روده‌ای گرم منفی و سودوموناس‌ها دارند. پنی سیلین‌های پیرازین مانند پیراسیلین و یوریدو پنی سیلین‌ها مانند مزلوسیلین و آزلسیلین حتی بسیار مؤثرتر از کربوکسی پنی سیلین‌ها علیه باکتری‌های روده‌ای و سودوموناس عمل می‌کنند. تمایل بسیار زیادی به PBPs باکتری‌های گرم منفی دارند و در درمان عفونت‌های حاصل از باکتری‌های گرم مثبت بسیار مؤثرتر از کربوکسی پنی سیلین‌ها می‌باشند.

۳-۱۲-۱ حالت‌های ترکیبی و آنالوگ‌ها: سه نوع آنالوگ پنی سیلین به‌طور تجاری در

دسترس هستند که عبارتند از : اسیدکلانولانیک، سولباکتام و تازوباکتام. اسیدکلانولانیک توسط استرپتومایسس کلایلزروس تولید می‌شود و سولباکتام از ۶-آیمنو پنی سیلانیک اسید ساخته می‌شود. ترکیبات در دسترس پنی سیلین و آنالوگ شامل: آمپی سیلین/ سولباکتام، آموکسی سیلین/ کلانولانیت، تیکارسیلین/ کلانولانیت و پیراسیلین/ تازوباکتام می‌باشند. آمپی سیلین/ سولباکتام و آموکسی سیلین/ کلانولانیت مثال‌هایی هستند که باعث گستردگی طیف عملکرد گردیده و دربرگیرنده سوش‌های تولیدکننده بتالاکتاماز شامل: باکترئیدوس فراژیلیس، انتروباکتر، اشرشیاکلی، کلبسیلا، موراکسلا کاتارالیس، نایسریاگنوره، پروتئوس، پروویدنسیا، استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی سیلین می‌باشند.



شکل ۲: مهارکننده های بتالاکتام (۳۱)

۱۳-۱ سایر آنتی بیوتیک‌های شبه پنی سیلین: دو کلاس جدید از آنتی

بیوتیک‌های شبه پنی سیلین توسط دانشمندان معرفی شده‌اند. این آنتی بیوتیک‌ها اساساً با روش متفاوتی تهیه شده‌اند و در آنها حلقه بتالاکتام متفاوت از پنی سیلین‌های استاندارد می‌باشد. این آنتی بیوتیک‌ها به نام کارباپنم‌ها و منوباکتام‌ها شناخته شده‌اند.

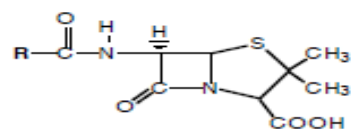
۱-۱۳-۱ کارباپنم‌ها: کارباپنم‌ها به‌طور سنتتیک از تینامایسین که به‌وسیله باکتری

استرپتومایسس کاتلیا تولید می‌شود، مشتق شده‌اند. اپرچه تینامایسین به خودی خود برای استفاده انسانی مناسب نمی‌باشد، اما یکی از مشتقات آن ایمی پنم است که به عنوان یک آنتی بیوتیک بتالاکتام با طیف وسیع امروزه در دسترس می‌باشد. کارباپنم‌ها دارای ساختار دوحلقه‌ای شامل حلقه بتالاکتام و یک حلقه پنج ضلعی می‌باشند که در موقعیت ۱ آن یک کربن به‌جای گوگرد قرار گرفته و در نتیجه حلقه به‌صورت غیراشباع می‌باشد. ایمی پنم با اتصال محکم به PBP-1 و PBP-2 از ترانس پتیداسیون ممانعت می‌کند، در حضور بیشتر بتالاکتام‌ها نظیر بتالاکتام‌های

کروموزومی کلاس ۱ که سفالوسپورین‌های نسل سوم را تجربه می‌کنند، پایدار می‌باشد. ایمی پنم‌ها به راحتی وارد باکتری‌های گرم منفی شده و علیه باکتری‌های بی‌هوازی فعال می‌باشند.

مروپنم کارباپنم دیگری است که اگرچه از لحاظ طیف عملکردی شبیه ایمی پنم است، ولی بدون سیلاستاتین هم تجویز می‌شود و خطر بروز ناگهانی بیماری در این داروها بسیار کمتر است.

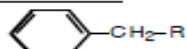
۱-۱۳-۲ منوباکتام‌ها: اولین آنتی بیوتیک منوباکتام، آزترئونام است. منوباکتام تنها یک حلقه و هسته مرکزی به به صورت ۳-آمینوباکتامیک اسید را دارند. برخلاف ایمی پنم، آزترئونام یک آنتی بیوتیک با طیف محدود می‌باشد که از طریق اتصال به PBP-3 از تقسیم سلولی ممانعت کرده و به PBP های باکتری‌های گرم مثبت به‌طور ضعیف متصل شده و یا اصلاً متصل نمی‌شود. در حضور آزترئونام، باکتری‌های گرم منفی در ابتدا به صورت فیلامنت‌هایی دراز رشد می‌کنند و در نهایت از بین می‌روند. آزترئونام در حضور بسیاری از بتالاکتام‌های گرم منفی پایدار بوده ولی با بتالاکتام‌های کد شده توسط پلاسمید که سفالوسپورین‌های نسل سوم مثل سفوتاکسیم و سفتازیدیم را غیرفعال کند، غیرفعال می‌شوند.



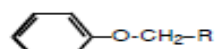
Penicillin

Side Chain

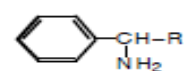
Penicillin G



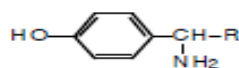
Penicillin V



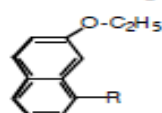
Ampicillin



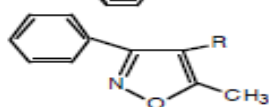
Amoxicillin



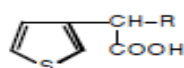
Nafcillin



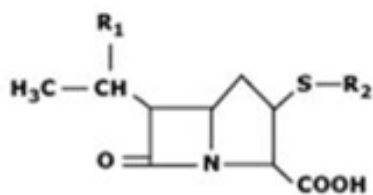
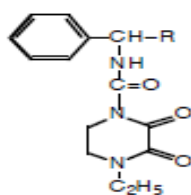
Oxacillin



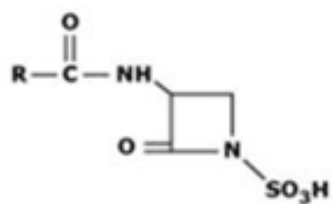
Ticarcillin



Piperacillin



Carbapenems



Monobactams

شکل ۳: ساختمان شیمیایی آنتی بیوتیک های بتالاکتام (۳۱)

۱-۱۴ سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها و آنتی بیوتیک‌های مشابه

▪ **سفالوسپورین‌های نسل اول:** اولین سفالوسپورین‌هایی که ظهور پیدا کردند

سفالوسپورین‌های نسل اول بودند. این آنتی بیوتیک‌ها به‌طور مؤثری برباکتری‌های گرم مثبت

نظیر پنوموکوک، استرپتوکوک، اپیدرمیدیس و استافیلوکوک اورئوس حساس به متی سیلین

مؤثر هستند. طیف عملکردی سفالوسپورین‌های نسل اول علیه باکتری‌های گرم منفی از لحاظ

بالینی محدود به باسیل‌های روده‌ای؛ اشرشیاکلی، کلبسیلا و پروتئوس میرابلیس می‌باشد.

اغلب سفالوسپورین‌های خوراکی از گروه نسل اول هستند.

▪ **سفالوسپورین‌های نسل دوم:** سفالوسپورین‌های نسل دوم نسبت به سفالوسپورین‌های

نسل اول تغییرات زیادی یافته‌اند. علاوه بر این بیشتر سفامایسین‌ها به‌عنوان آنالوگ‌های

سفالوسپورین‌های نسل دوم در نظر گرفته شده‌اند. سفالوسپورین‌های نسل دوم در مقابل

باکتری‌های گرم منفی بسیار فعال‌تر هستند و تأثیر آنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت در

مقایسه با سفالوسپورین‌های نسل اول کمتر است. سفوروکسیم علیه سویه‌های تولیدکننده

بتالاکتاماز هموفیلوس آنفلوانزا و نایسریا منتریتیدیس (دو عامل مهم مننژیت نوزادان) بسیار

مؤثر است. علاوه بر این سفوتتان و سفوکسیتین علیه نایسریاگنوره‌آ و سویه‌های تولیدکننده

پنی سیلیناز این باکتری مؤثر است. سفامایسین و سفوتتان علیه باسیل‌های گرم منفی روده‌ای

نظیر اشرشیاکلی، کلبسیلا و پروتئوس که اغلب با آنتی بیوتیک‌های نسل سوم درمان می‌شوند،

مؤثر است.

▪ سفالوسپورین‌های نسل سوم: سفالوسپورین‌های نسل سوم به علت دارا بودن گروه‌های

بزرگ و غیرمعمول R، مقاومت بالایی نسبت به عمل بتالاکتامازها دارند. اگرچه سفالوسپورین‌های نسل سوم دارای طیف وسیعی فعالیت علیه باکتری‌های گرم منفی هستند، اما در برابر باکتری‌های گرم مثبت تأثیر بسیار محدودی دارند. در حالتی کلی سفالوسپورین‌های نسل سوم تأثیر زیادی علیه ارگانسیم‌های گرم منفی؛ نایسریا گنوره آ شامل سویه‌های تولید کننده پنی سیلیناز، نایسریا مننژیتیدیس، هموفیلوس آنفلوانزا، مورکسلا کاتارالیس و اغلب باکتری‌های روده‌ای شامل بسیاری از سویه‌های سیتروباکتر، اشرشیاکلی، کلبسیلا، مورگانلا، پروتئوس، پروویدنسیا، سالمونلا و شیگلا دارند. تأثیر فوق العاده این آنتی بیوتیک‌ها در برابر باکتری‌ها به علت تمایل بالای این آنتی بیوتیک‌ها به PBP های گرم منفی و مقاومت غیرمعمول آنها نسبت به غیرفعال شدن توسط بتالاکتامازها، می‌باشند. سفالوسپورین‌های نسل سوم به وسیله بتالاکتامازهای کلاس I کروموزومی (که به وسیله برخی از سویه‌های سیتروباکتر، انتروباکتر و سودوموناس‌ها تولید می‌شود) غیرفعال می‌شوند، اما این آنتی بیوتیک‌ها در برابر سایر بتالاکتامازها مقاوم هستند. سفتازیدیم فعالیت شدیدی علیه سودوموناس آئروژینوزا دارد، سفوپرازون نیز فعالیت ضد سودوموناسی متوسطی دارد.

▪ سفالوسپورین‌های نسل چهارم: سفپیم و سفپروم جدیدترین سفالوسپورین‌های عرضه

شده می‌باشند. اگرچه فعالیت این داروها بر روی باکتری‌های گرم منفی شبیه سفالوسپورین‌های نسل سوم می‌باشد، اما آنتی بیوتیک‌ها از نظر تأثیر بر روی باکتری‌های گرم

مثبت مشابه سفالوسپورین‌های نسل اول هستند. برخی پزشکان و داروسازان این آنتی بیوتیک‌ها را با عنوان سفالوسپورین‌های نسل چهارم می‌نامند.

۱۵-۱ مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام

مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام ممکن است در نتیجه جهش یک ژن کروموزومی و یا انتقال یک پلاسمید، کسب شود.

۱-۱۵-۱ تغییر در نفوذپذیری باکتری: نفوذپذیری باکتری‌ها ممکن است در نتیجه تغییر

در پورین‌های غشا خارجی و لیپوپلی ساکارید، کاهش یابد. غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی به صورت نامتقارن بوده و از پورین‌ها و مولکول‌های لیپوپلی ساکاریدی که در یک صفحه خارجی الحاق شده‌اند، تشکیل شده است. باکتری اشرشیاکلی حدود 1×10^6 پورین به ازای هر سلول دارد، برخی از این پورین‌ها مانند OmpF کانال بزرگ و برخی نظیر OmpC کانال کوچک ایجاد می‌کنند.

اگر غشا خارجی اشرشیاکلی با کانال‌های OmpC اشغال شود، کاربنی سیلین و سایر داروها که معمولاً به آرامی نفوذ می‌کنند، توانایی ورود به باکتری را نخواهند داشت. برخلاف انواع اشرشیاکلی، در صورت تغییر در محتوای لیپوپلی ساکاریدی انتروباکتر کلوآکه و سودوموناس آئروژینوزا، حساسیت این باکتری‌ها در برابر پنی سیلین تغییر چشمگیری خواهد داشت.

۲-۱۵-۱ **تغییرات افینیتی هدف:** سومین مکانیسم عمده مقاومت به آنتی بیوتیک‌های

بتالاکتام، تغییر در گرایش و افینیتی PBP ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام است. مهمترین جنبه بالینی این نوع مقاومت مربوط به استافیلوکوک اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین است.

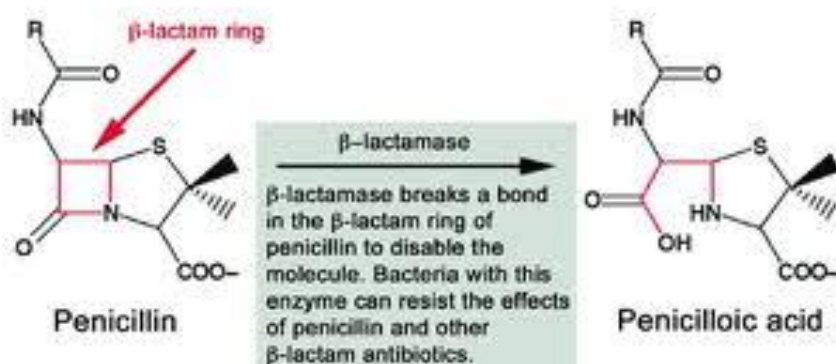
۳-۱۵-۱ **ناتوانی در تحریک اتولیز:** برخی از باکتری‌ها تحت عنوان متحمل نسبت به

آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در نظر گرفته می‌شوند. در این ارگانیزم‌ها، آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام توانایی القا تحریک اتولیز را نداشته و لذا نسبت حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) به حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) حدود ۳۲ یا بیشتر می‌باشد.

۴-۱۵-۱ **تأثیرات بتالاکتام‌ها:** یکی از مهمترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیک،

تولید بتالاکتام‌هاست. یک بتالاکتام‌از، آنزیمی است که به‌صورت غیرکووالان به آنتی بیوتیک بتالاکتام متصل شده، سپس با برقراری اتصال کووالان و هیدرولیز پیوند آمیدی در حلقه لاکتام موجب تجزیه و تغییر (غیرفعال نمودن) آنتی بیوتیک می‌شود. بتالاکتام‌ها با PBP ها برای آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام رقابت می‌کنند (۳۱).

Penicillin Resistance



شکل ۴: تغییرات آنزیماتیک ساختار پنی سیلین (۳۱)

۱۶-۱ طبقه بندی بتالاکتامازها

طبقه بندی بتالاکتامازها به طور سنتی براساس خصوصیات عملکردی آنزیم‌ها یا ساختار اولیه آنها صورت می‌گرفته است. ساده‌ترین طبقه‌بندی براساس سکانس پروتئینی و تفاوت الگوی آمینواسیدی است که به موجب آن، بتالاکتامازها به چهار کلاس A، B، C و D تقسیم می‌شوند. کلاس A، C و D شامل آنزیم‌هایی است که سوبسترایشان را به وسیله تشکیل یک آنزیم آسیل از طریق یک سرین سایت فعال، هیدرولیز می‌کنند، در حالی که کلاس B متالوآنزیم‌هایی هستند که حداقل از یک یون روی در محل فعال برای تسهیل هیدرولیز بتالاکتام استفاده می‌کنند. اگرچه روش ساختاری، آسان‌ترین راه طبقه‌بندی است، اما یک طبقه‌بندی عملکردی فرصتی برای ارتباط آنزیم‌های گوناگون با نقش بالینی آنها را فراهم می‌کند. در طبقه‌بندی عملکردی اخیر، آنزیم‌ها براساس توانایی هیدرولیز کلاس‌های

خاصی از داروهای بتالاکتام و خصوصیات غیرفعال شدن آنها توسط مهارکننده‌های بتالاکتام مثل اسیدکلانولانیک، سولباکتام و آرترونام تقسیم می‌شوند.

▪ **گروه ۱:** سفالوسپورین‌های متعلق به کلاس C موکلولی بوده و در بسیاری از انتروباکتریاسه و تعداد کمی از سایر ارگانیسم‌ها بر روی کروموزوم کد می‌شوند. فعالیت آنها بر روی سفالوسپورین‌ها نسبت به بنزیل پنی سیلین، بیشتر بوده و معمولاً به مهار شدن توسط اسیدکلانولانیک مقاوم هستند. از سال ۱۹۸۹ آنزیم‌هایی از گروه ۱ که وابسته به پلاسمید هستند مثل CMY، ACT، DHA، FOX، MIR هم شناسایی شدند، اما نسبت به بتالاکتام‌های وسیع الطیف زیرگروه 2be که پلاسمیدی هستند، شیوع کمتری دارند. زیرگروه جدیدی به نام 1e فعالیت بیشتری علیه سفتازیدیم و سایر اکسی‌ایمینیوتالاکتام‌ها دارد و این به علت جایگزینی یک اسیدآمین به سبب حذف یا اضافه شدن می‌باشد. آنها شامل Ampc بتالاکتام‌هایی مانند GCI و بتالاکتام‌های وابسته به پلاسمید مانند CMY₁₀ و CMY₁₉ می‌باشند.

▪ **گروه ۲:** سرین بتالاکتام‌های متعلق به کلاس مولکولی A و D می‌باشند. این گروه نماینده بزرگ‌ترین گروه بتالاکتام‌های شناسایی شده در طی بیست سال اخیر است.

زیرگروه 2a: نماینده گروه کوچکی از بتالاکتام‌ها با فعالیت هیدرولیز کنندگی نسبتاً محدود در استافیلوکوک و گاهی انتروکوک می‌باشد. این آنزیم‌ها باعث هیدرولیز بنزیل پنی سیلین و بسیاری از مشتقات پنی سیلین شده و فعالیت هیدرولیز کنندگی ضعیفی علیه سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و

مونوباکتام‌ها دارند و میزان فعالیت آنها بر روی بنزیل پنی‌سیلین یا آمپی‌سیلین، معمولاً کمتر یا مساوی ۱۰ درصد است. زیرگروه 2a بتالاکتام‌ها توسط اسیدکلاولانیک و تازوباکتام با غلظت ۵۰ درصد مهار می‌شود. اکثر این آنزیم‌ها کروموزومی هستند.

زیرگروه 2b: این گروه پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های اولیه مانند سفالوزیدین و سفالوتین را هیدرولیز می‌کند و توسط اسیدکلاولانیک و تازوباکتام مهار می‌شود. آنزیم‌های TEM-1 و TEM-2 و SHV-1 شایع‌ترین بتالاکتام‌های وابسته به پلاسמיד شناسایی شده از دهه ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ هستند.

زیرگروه 2be: این آنزیم‌ها مانند گروه 2b دارای فعالیت علیه پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها هستند. اضافه شدن e به آخر 2b بیانگر فعالیت با طیف گسترده یا ESBL است که توانایی غیرفعال کردن سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند سفنازیدیم، سفوتاکسیم، سفپودوکسیم و آرترونام را دارد. اولین و بزرگ‌ترین زیرمجموعه از زیرگروه 2be به وسیله جایگزین شدن اسیدآمین در TEM-1 و TEM-2 و SHV-1 مشتق شده‌اند که باعث افزایش میزان فعالیت هیدرولیزکنندگی آنها علیه بنزیل پنی‌سیلین و سفالوریدین شده است. CTX-M نیز در این گروه قرار گرفته که میزان مهارشوندگی آن توسط تازوباکتام، حداقل بوده ولی توسط اسیدکلاولانیک بهتر مهار می‌شود. از سایر بتالاکتام‌های این گروه که شیوع کمتری دارند، می‌توان به BEL-1، BES-1، SFO-1، TLA-1، TLA2 اشاره کرد.

زیر گروه 2br: این گروه از بتالاکتام‌های با طیف گسترده، مقاوم به اسیدکلاولانیک هستند. تاکنون ۳۶ عدد از ۱۳۵ آنزیم TEM شناسایی شده و ۵ عدد از ۷۲ آنزیم SHV شناسایی شده، دارای این

خصوصیت هستند، مثل TEM-30، TEM-31، SHV-10. تاکنون هیچ آنزیم CTX-M با این خصوصیت مورد شناسایی قرار نگرفته است.

زیرگروه 2ber: این گروه شامل آنزیم‌های TEM مقاوم به اسیدکلاولانیک بوده و CMT بتالاکتاماز نیز نامیده می‌شود که از میان آنها می‌توان به TEM-50 یا CMT-1 اشاره کرد.

زیرگروه 2C: پنی‌سیلینازهایی با توانایی هیدرولیز کردن کاربنی‌سیلین و تیکار سیلین هستند. این آنزیم‌ها به راحتی با اسیدکلاولانیک یا تازوباکتام مهار می‌شوند.

زیرگروه 2ce: کاربنی‌سیلینازهای وسیع‌الطیف RTG-4 با فعالیت علیه سفپیم و سفپروم هستند.

زیرگروه 2d: شامل بتالاکتامازهایی با توانایی هیدرولیز کلواگزاسیلین، اگزاسیلین است و گاهی کاربنی‌سیلین را نسبت به بنزیل‌پنی‌سیلین بیشتر غیرفعال می‌کند و به نام OXA خوانده می‌شود. تعداد زیادی از بتالاکتامازهای این زیرگروه توسط NaCl مهار می‌شود. این آنزیم‌ها اکنون دومین خانواده بزرگ بتالاکتاماز را تشکیل می‌دهند. زیرگروه جدیدی به نام 2de، آنزیم‌های هیدرولیزکننده اگزاسیلین و کلواگزاسیلین بوده و طیف وسیعی از اکسی‌ایمنوبتالاکتام‌ها را دربرمی‌گیرد. اکثر آنزیم‌های 2de از OXA-10 در اثر جایگزینی بین اسیدآمینه ۱ و ۹ مشتق می‌شوند و شامل OXA-11 و OXA-15 می‌باشند.

زیرگروه جدیدی به نام 2df بتالاکتاماز، آنزیم‌های OXA با فعالیت هیدرولیز کردن کارباپنم هستند. این آنزیم‌ها اغلب در آسینتوباکتریومانی رایج بوده و کروموزومی هستند. اگرچه OXA-48 و OXA-23 شناسایی شده در انتروباکتریاسه پلاسمیدی هستند.

زیرگروه 2e: سفالوسپورینازهایی با فعالیت هیدرولیزکنندگی سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بوده و توسط اسیدکلاولانیک یا تازوباکتام مهار می‌شوند. سفالوسپورین‌های کروموزومی القا شونده در این گروه اغلب با آنزیم‌های Ampc یا ESBLs به دلیل ظاهر شدن در ارگانسیم‌های مشابه و یا الگوی مقاومتی یکسان اشتباه می‌شوند، اما به علت میل ترکیبی کم به آرتراونام از Ampc بتالاکتامازها افتراق داده می‌شوند.

زیرگروه 2f: کارباپنمازهایی متعلق به کلاس موکلولی A هستند. کارباپنم‌ها سوبسترای این آنزیم‌ها بوده و توسط تازوباکتام بهتر از اسیدکلاولانیک مهار می‌شود. خانواده SME، نماینده آنزیم‌های 2f بوده و کروموزومی هستند، اما عمده نگرانی به علت بتالاکتامازهای پلاسمیدی شامل KPC و GES می‌باشد. اخیراً KPC کارباپنمازها با شیوع عفونت‌های باکتری‌های گرم منفی با مقاومت چند دارویی در ارتباط بوده است.

▪ **گروه ۳ (MBLs):** متالوبتالاکتامازهایی هستند که از سایر بتالاکتامازها از لحاظ ساختاری،

به علت نیاز به یون روی در جایگاه هدف، افتراق داده می‌شوند. این گروه توانایی هیدرولیزی کمی برای مونوباکتام‌ها داشته و توسط اسیدکلاولانیک یا تازوباکتام مهار نمی‌شود، اما توسط

شلاته کننده‌های یون‌های فلزی مانند EDTA، اسیددی‌پیکولینیک و ۱ و O۱۰ فنانترولین مهار می‌شوند. متالوآنزیم‌ها براساس ساختار به زیرگروه‌های B₁، B₂، B₃ و براساس عملکرد به زیرگروه‌های 3a، 3b و 3c تقسیم می‌شوند. متالوآنزیم‌ها در اصل به‌صورت آنزیم‌های کروموزومی در باکتری‌های گرم مثبت و گاهی در باسیل‌های گرم منفی مانند باکتریوئیدس فراژیلیس و استنوتروفوموناس‌مالتوفلیا شناسایی شده‌اند.

▪ **گروه ۴:** قبلاً در سال ۱۹۹۵ در طبقه‌بندی عملکردی قرار گرفته‌اند، اما اکنون حذف شده و

تاکنون به‌درستی شناسایی نشده‌اند (۳۲).

جدول ۲: طبقه بندی بتالاکتاماز (۳۲)

TABLE 1. Classification schemes for bacterial β -lactamases, expanded from Bush et al. (16)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GCI, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiofame	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

۱۷-۱ بتالاکتامازهای با طیف گسترده

TEM ۱-۱۷-۱

TEM از *Temoneria* ، نام بیماری که اولین بار در یونان این باکتری از آن جدا شد گرفته شده است (۳۳). آنزیم TEM اولین بار از اشرشیا کلی در سال ۱۹۶۵ گزارش شد. در حال حاضر شایع ترین بتالاکتاماز در انتروباکتریاسه می باشد (۳۴). TEM-1 شایع ترین آنزیم این گروه می باشد. TEM-1 شایع ترین بتالاکتاماز در بین باکتری های گرم منفی و مسئول بیش از ۹۰ درصد مقاومت به آمپی سیلین در اشرشیا کلی است. این آنزیم باعث مقاومت به آمپی سیلین و پنی سیلین در نیسریا گنوره و هموفیلوس انفلوانزا می شود. TEM-1 قادر به هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورین های نسل اول مثل سفالوتین و سفالوریدین است (۳۵). TEM-2 یکی از مشتقات TEM-1 است که در نتیجه جایگزین شدن یک سرین به جای گلوتامین در موقعیت ۳۹ به وجود آمده است (۳۶). اگر چه آنزیم TEM بیشتر در اشرشیاکلی و کلبسیلاپنومونیه وجود دارد، اما در باکتری های گرم منفی مثل انتروباکتر آئروجنز، مورگانلا مورگانی، پروتئوس میرابیلیس، پروویدنسیا رجری و گونه های سالمونلا نیز گزارش شده است (۳۵). تا ماه می سال ۲۰۱۱ ، ۱۹۰ نوع آنزیم TEM گزارش شده است

TEM-12 , TEM-10 , TEM-26 ، شایع ترین آنزیم های TEM در ایالات متحده امریکا هستند (۳۷).

SHV ۲-۱۷-۱

SHV یک آنزیم کروموزومی که در سال ۱۹۷۲ توسط *piton* در بریتانیا در یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه توصیف شد و ابتدا *pit-2* نام گرفت اما بعد *SHV_1* نامیده شد. *SHV_1* تقریباً در ۶۸ درصد سکانس های آمینواسیدی به *TEM_1* شباهت دارد. *SHV_1* اغلب در کلبسیلا پنومونیه وجود داشته و باعث مقاومت به آمپی سیلین می شود. بتالاکتامازهای وسیع الطیف در این گروه از جایگزینی اسید آمینه در موقعیت ۲۳۸ یا ۲۳۸ و ۲۴۰ ناشی می شوند. تا اواخر ماه می سال ۲۰۱۱، ۱۴۱ نوع SHV گزارش شده است. این گروه از آنزیم ها نه تنها در امریکابلکه در سایر مناطق جغرافیایی نیز وجود دارند. شایع ترین آنزیم های این گروه *SHV_5* و *SHV_11* هستند (۳۷).

CTX-M ۳-۱۷-۱

این گروه به علت مقاومت بیشتر به سفوتاکسیم نسبت به اکسی ایمینوبتالاکتام ها مثل سفتازیدیم، سقتریاکسون و سفپیم به این نام خوانده می شوند. گسترش این آنزیم ها به علت کسب بتالاکتاماز کد شونده پلاسمیدی مشتق شده از باکتری غیر بیماریزای *kluyvera* به ویژه *k.ascorbata* و *k.georgiana* است. شباهت این آنزیم به *TEM* و *SHV*، ۴۰ درصد می باشد. تا آخر ماه می سال ۲۰۱۱، ۱۲۰ نوع از این آنزیم گزارش شده که توسط سکانس آمینواسیدی در ۵ گروه *CTX-M₁*، *CTX-M₂*، *CTX-M₈*، *CTX-M₉*، *CTX-M₂₅* طبقه بندی می شوند.

این گروه از آنزیم ها اغلب در سالمونلا انتریکا، سالمونلا تیفی موریوم، اشرشیا کلی و گاهی سایر انتروباکتریاسه یافت شده است. CTX-M₁₅ در حال حاضر شایع ترین CTX-M یافت شده در ایزوله اشرشیاکولی در UK است (۳۷).

۴-۱۷-۱ PER

تشابه آمینواسیدی آن با TEM و SHV، ۲۵-۲۷ درصد است. PER بتالاکتامازها پنی سیلین و سفالوسپورین ها را هیدرولیز کرده و توسط اسید کلولانیک مهار می شوند. در گذشته PER معمولاً "از سودوموناس آئروجینوزا جدا می شد، اما اکنون از سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم و گونه های آسیتوباکترینز جدا شده است. بتالاکتاماز وسیع الطیف PER در سرتاسر جهان وجود دارد، اما در اروپا شایع تر هستند (۳۷).

۵-۱۷-۱ OXA

اگزاسیلینازها که در کلاس D قرار می گیرند، به گستردگی کلاس A و C مورد مطالعه قرار نگرفته اند، اما این مسأله با توجه به افزایش اخیر تعداد گزارش های بالینی گسترده پاتوژن هایی که مقاومت مرتبط با OXA را نشان می دهند، در حال تغییر است.

اگزاسیلین بتالاکتامازها در طبقه بندی آمبلر که اساس آن را سکانس های آمینواسیدی تشکیل می داد متعلق به کلاس D بوده و در جایگاه فعال خود دارای سرین می باشند. این دسته از بتالاکتامازها نسبت به آمینوپنی سیلین و یوریدوپنی سیلین مقاوم هستند (۳۹).

بتالاکتامازها س کلاس D معمولاً" توسط اسیدکلاولانیک، تازوباکتام و سولباکتام مهار نمی شوند در حالیکه فعالیت آنها در invitro توسط کلرید سدیم (NaCl) مهار می شود. این ویژگی در میان سایر کلاس های بتالاکتاماز وجود ندارد. بنابراین می تواند به عنوان یک ویژگی مفید در شرایط آزمایشگاهی مطرح باشد. کلرید سدیم در غلظت ۱۰۰۰ میلی مولار فعالیت اکثر بتالاکتامازها را مهار می کند. این خصوصیت به طور واضح توضیح داده نشده، اما حداقل می تواند با وجود یک تیروزین در موقعیت ۱۴۴ مرتبط باشد. جهش زایی در شرایط آزمایشگاهی نشان داده که جایگزینی یک تیروزین به جای فنیل آلانین در آن موقعیت باعث مقاومت به مهار توسط کلرید سدیم می شود (۴۰). در طبقه بندی دیگری که توسط کارن بوش در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، بتالاکتامازها شامل ۴ گروه بودند که اگزاسیلین بتالاکتامازها به این ترتیب در گروه ۲ و در زیرگروه d ۲ قرار گرفتند (۳۹). برهمین اساس فعالیت هیدرولیز کنندگی بالا علیه اگزاسیلین و کلوگزاسیلین و مهارشوندگی ضعیف توسط اسید کلاولانیک به ۵ گروه تقسیم می شوند. بر این اساس گروه ۱ شامل (۵-۷-۱۰-۱۳) OXA، گروه ۲ شامل (۲-۳-۱۵-۲۰) OXA و گروه ۳ شامل (۱-۴-۳۰-۳۱)، گروه ۴ شامل (OXA-۹) و گروه ۵ شامل LCR می باشد (۶).

▪ زیرگروه های OXA-1

مولوی و بویید OXA-1، بتالاکتاماز و OXA-30 را یکسان در نظر گرفتند. ژن *bla*_{OXA-1} در ایتنگرون و پلاسمید انواع زیادی از باکتری های گرم منفی یافت شده است. OXA-1 بتالاکتاماز مشابه اکثر OXA ها باعث هیدرولیز آمینو پنی سیلین و کربوکسی پنی سیلین شده و سفالوسپورین های با

طیف محدود را به طور ضعیفی هیدرولیز می‌کند. همچنین OXA-1 به طور جزئی سفالوسپورین‌های با طیف گسترده را نیز هیدرولیز کرده و به سفپیم و سفپروم کاهش حساسیت پیدا کرده است. بنابراین می‌تواند به عنوان بتالاکتاماز با هر دو طیف محدود و گسترده هیدرولیز کنندگی طبقه بندی شود. ژن *bla*_{OXA-1} اغلب در گونه‌های انتروباکتریاسه مقاوم به آمپی سیلین مثل اشرشیاکلی، شیگلا فلکسنری و گونه‌های سالمونلا و گونه‌های انتروباکتریاسه اکتسابی از جامعه و در ایزوله‌های انسان و حیوان شناسایی شده است. برای مثال در گونه‌های شیگلادیسانتری نواحی جغرافیایی مختلف و در ایزوله‌های سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریم جدا شده از انسان‌ها و محصولات غذایی حیوانی در پرتغال یافت شده است. در میان مشتقات OXA-1 هیچ یک از واریانت‌ها توانایی هیدرولیز سفنازیدیم را ندارند.

▪ زیرگروه OXA-2

بتالاکتامازی با طیف محدود که در ۳۰ درصد اسیدهای آمینه با OXA-1 مشابهت دارد و به همراه مشتقاتش OXA-3، OXA-15، OXA-21، OXA-32، OXA-34، OXA-36، OXA-53 یک دسته مجزا را تشکیل می‌دهند. ژن *bla*_{OXA-1} اغلب در ایزوله‌های سودوموناس آئروجینوزا و سالمونلا تیفی موریم تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف PER-1 زمانی که واریانتی از OXA-3 را دارند یافت شده است. همچنین در سایر گونه‌ها مثل مورگانلا مورگانی در آرژانتین، کلبسیلا پنومونیه در اروگوئه، اشرشیاکلی در فرانسه و در بوردوتلا برونشی سپتیکا، آئروموناس هیدوفیلیا و حتی در گونه‌های گرم مثبت کورینه باکتریوم آمیکولاتوم گزارش شده است.

▪ زیرگروه OXA-10

بتالاکتاماز OXA-10 که PSE-2 نیز نامیده می‌شود، دارای توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، آزرئونام در سطح پایین بوده و به مقدار کم نیز سفتازیدیم، سفامایسین و کارباپنم را هیدرولیز می‌کند. ژن *bla*_{OXA-10} در انواع زیادی از گونه‌های باکتری‌های گرم منفی یافت شده و اغلب در سودوموناز آئروجنوزا مورد شناسایی قرار گرفته است. تعدادی از مشتقات OXA-10 ناشی از موتاسیون‌های نقطه‌ای شامل OXA-11، OXA-13، OXA-16، OXA-28، OXA-35، OXA-74 است که دارای فعالیت افزایش یافته به سمت سفالوسپورین‌های با طیف گسترده است.

۱۸-۱ سایر زیر گروه‌ها:

▪ OXA-9: دارای یک خصوصیت ناشایع بوده و توسط اسیدکلاولانیک و کلوگراسیلین

مهار می‌شود، اما قادر به مهار شونده‌گی توسط کلرید سدیم نمی‌باشد. ژن *bla*_{OXA-9} اولین بار بر روی پلاسمید کلبسیلاپنومونیه شناسایی شد و همچنین در یک انتروباکتر کلوآکه از کانادا و انتروباکتر آئروجنز از فرانسه گزارش گردید.

▪ LCR-1: یکی از اولین بتالاکتامازهایی بود که تنها براساس خصوصیات بیوشیمیایی

شناسایی شد. این بتالاکتاماز از سودوموناس آئروژینوزا جدا شده و تنها قادر به هیدرولیز پنی سیلین‌ها، نیتروسفین و اگراسیلین است. اخیراً سکانس‌های آمینواسیدی این بتالاکتاماز نشان داده که در ۴۰ درصد از اسیدهای آمینه مشابه با سایر OXA هاست (۴۰).

۱۹-۱ انتخاب دارو و مقاومت دارویی

در میان فاکتورهایی که می‌توانند باعث کاهش بیماری و مرگ و میر در عفونت‌های تهاجمی ناشی از باسیل‌های گرم منفی شوند، اولین عامل انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب است. معرفی آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در سیستم‌های مراقبت سلامتی بعد از جنگ جهانی دوم، نشان دهنده یکی از مهمترین مساعدت‌ها به علم پزشکی در تاریخ اخیر است (۴۱). مجموعه داروهای بتالاکتام یکی از فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای تجویزی علیه این میکروارگانیسم‌ها هستند که در سال‌های اخیر پیدایش گونه‌های مقاوم دارویی این ارگانیسم‌ها، نگرانی‌های زیادی را برای پزشکان جهت انتخاب آنتی بیوتیک مناسب در پروسه درمانی ایجاد کرده است (۲).

مقاومت ضد میکروبی مسأله مهمی است که بیماران بیمارستان را در سرتاسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. تولید بتالاکتام‌های وسیع الطیف در میان اعضای خانواده انتروباکتریاسه یکی از مشکل‌ترین مسائل بالینی مرتبط با درمان و اپیدمیولوژی می‌باشد (۴۲). در سال‌های اخیر افزایش چشمگیری در شیوع باکتری‌های تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBLs) وجود داشته است. بتالاکتام‌های وسیع الطیف، آنزیم‌های کد شونده پلاسمیدی هستند که باعث هیدرولیز حلقه بتالاکتام و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و مونوباکتام مثل آزترئونام می‌شوند (۴۳). این پلاسمیدها اغلب حامل ژن مقاومت به سایر انواع آنتی بیوتیک‌ها بوده و کد کننده فنوتیپ‌های مقاومتی چند دارویی هستند که گزینه‌های درمانی را محدود می‌کند (۴۲).

هیدرولیز آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام به وسیله بتالاکتاماز یکی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت برای این کلاس از عوامل ضد باکتریایی در میان باکتری‌های گرم منفی مهم از نظر بالینی است. به دلیل اینکه پنی سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند، وجود و خصوصیات این آنزیم‌ها نقش مهمی در انتخاب داروی مناسب ایفا می‌کند. تولید بتالاکتاماز یکی از رایج‌ترین موارد مورد تردید در ایزوله‌های باکتری‌های گرم منفی است که عامل مقاومت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در نظر گرفته می‌شود (۳۲). گونه‌های انتروباکتر به‌طور افزایشی به پاتوژن‌های مهم بیمارستانی تبدیل شده‌اند. مقاومت به سفالوسپورین‌ها اغلب درمان عفونت‌های ناشی از انتروباکتر را پیچیده کرده است (۴۴). شیوع بیمارستانی انتروباکتر آئروجنز با مقاومت چندگانه، یک نگرانی در حال گسترش در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) است. عفونت به وسیله این ارگانیسم اغلب در مراحل اولیه تشخیص داده نمی‌شود و کنترل و درمان آن نیز مشکل است (۱۹).

تعیین بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در گونه‌های انتروباکتر، یک مسأله مهم در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی است، زیرا مکانیسم عمده مقاومت، تولید بیش از حد Ampc بتالاکتامازهای کروموزومی می‌باشد که می‌تواند باعث پنهان ماندن ESBLs شود. آزمایشگاه‌های میکروب شناسی باید از پیدایش ESBLs در انتروباکتر کلوآکه تولید کننده Ampc بتالاکتاماز، آگاه باشند (۴۲).

اخیرا در یک مطالعه ۳۶ درصد از عفونت‌های انتروباکتر در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) به سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مقاوم بودند. علاوه بر این ایزوله‌های انتروباکتر ممکن است در ابتدا به سفالوسپورین‌ها در خارج بدن حساس باشند، اما در طی درمان گسترش مقاومت به علت تولید

بتالاکتاماز اتفاق می‌افتد. احتمال می‌دهند که عفونت ناشی از انتروباکترهای مقاوم می‌تواند باعث مرگ و میر بالاتر، بستری طولانی مدت‌تر و هزینه بیشتری از سایر گونه‌های حساس باشند (۴۴).

انتروباکتر کلواکه دارای مقاومت ذاتی به آمپی سیلین و سفالوسپورین‌های با طیف محدود بوده و میزان بالایی از موتاسیون برای مقاومت به سفالوسپورین‌های با طیف گسترده را دارد. در مطالعه‌ای که توسط امین^۶ و همکارانش انجام شد، فراوانی انتروباکتر کلواکه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، ۱۴/۹۳ درصد گزارش شد. در مطالعه‌ای که توسط راوال پیندی^۷ در دانشگاه پزشکی ارتش صورت گرفت، فراوانی انتروباکتر کلواکه مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، ۷۹ درصد گزارش شد. در مطالعه انجام شده در کراچی پاکستان، فراوانی انتروباکتر کلواکه تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs)، ۵۰ درصد، در لاوس نیجریه، ۳۷/۵ درصد و در مرکز پزشکی پترزبورگ، ۳۳/۳۳ درصد گزارش شد (۴۳).

۲۰-۱ بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) به روش

فوتیپی

۱-۲۰-۱ تست غربالگری

طبق توصیه CLSI ایزوله‌هایی که قطر هاله عدم رشد دیسک سفتازیدیم ($30\mu g$) ≥ 22 میلی متر، دیسک سفتریاکسون ($30\mu g$)، دیسک سفوتاکسیم ($30\mu g$)، دیسک سفپودوکسیم ($30\mu g$) ≥ 27 میلی

^۶ Amin

^۷ Rawalpindi

متر و دیسک آزرئونام ($30\mu\text{g}$) ≥ 25 میلی متر باشد به عنوان ارگانسیم بالقوه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بوده و باید تست تائیدی برای این ایزوله ها صورت گیرد (۴۵).

جدول ۳: روش غربالگری بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) (۴۵).

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
Test method	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Medium	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Antimicrobial concentration	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10 μg or Ceftazidime 30 μg or Aztreonam 30 μg or Cefotaxime 30 μg or Ceftriaxone 30 μg For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 10 μg or Ceftazidime 30 μg or Cefotaxime 30 μg (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 4 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftazidime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Aztreonam 1 $\mu\text{g/mL}$ or Cefotaxime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftriaxone 1 $\mu\text{g/mL}$ For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Ceftazidime 1 $\mu\text{g/mL}$ or Cefotaxime 1 $\mu\text{g/mL}$ (The use of more than one antimicrobial agent for screening improves the sensitivity of ESBL detection.)	Ceftazidime 30 μg Ceftazidime-clavulanic acid* 30/10 μg and Cefotaxime 30 μg Cefotaxime-clavulanic acid 30/10 μg (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)	Ceftazidime 0.25–128 $\mu\text{g/mL}$ Ceftazidime-clavulanic acid 0.25/4–128/4 $\mu\text{g/mL}$ and Cefotaxime 0.25–64 $\mu\text{g/mL}$ Cefotaxime-clavulanic acid 0.25/4–64/4 $\mu\text{g/mL}$ (Confirmatory testing requires use of both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanic acid.)
Inoculum	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations	Standard disk diffusion recommendations	Standard broth dilution recommendations
Incubation conditions	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air	35 \pm 2°C; ambient air
Incubation length	16–18 hours	16–20 hours	16–18 hours	16–20 hours

۲-۲۰-۱ تست تائیدی تولید ESBLs

۱-۲-۲۰-۱ روش دیسک ترکیبی

در کنار هر یک از دیسک های ذکر شده اقدام به گذاشتن دیسک ترکیبی حاوی مهارکننده می کنیم. مثلا در کنار دیسک سفوتاکسیم از دیسک سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$) و کلاولانیک اسید ($10\mu\text{g}$) استفاده می کنیم. در صورتیکه اختلاف قطر هاله عدم رشد ۲ دیسک بزرگتر یا مساوی ۵ میلیمتر باشد نشانه تولید آنزیم ESBLs می باشد که توسط مهارکننده موجود در دیسک حاوی کلاولانیک اسید مهار شده و در نتیجه هاله عدم رشد بزرگتری را ایجاد کرده است (۴۵).

جدول ۴: روش تاییدی بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) (۴۵).

Test	Initial Screen Test		Phenotypic Confirmatory Test	
Test Method	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Results	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime zone ≤ 17 mm Ceftazidime zone ≤ 22 mm Aztreonam zone ≤ 27 mm Cefotaxime zone ≤ 27 mm Ceftriaxone zone ≤ 25 mm For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime zone ≤ 22 mm Ceftazidime zone ≤ 22 mm Cefotaxime zone ≤ 27 mm Zones above may indicate ESBL production.	Growth at or above the screening concentrations may indicate ESBL production (ie, for <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , and <i>K. oxytoca</i> , MIC ≥ 8 μ g/mL for cefpodoxime or MIC ≥ 2 μ g/mL for ceftazidime, aztreonam, cefotaxime, or ceftriaxone; and for <i>P. mirabilis</i> , MIC ≥ 2 μ g/mL for cefpodoxime, ceftazidime, or cefotaxime).	A ≥ 5 -mm increase in a zone diameter for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the zone diameter of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime zone = 18; ceftazidime-clavulanic acid zone = 21).	A ≥ 3 twofold concentration decrease in an MIC for either antimicrobial agent tested in combination with clavulanic acid vs the MIC of the agent when tested alone = ESBL (eg, ceftazidime MIC = 8 μ g/mL; ceftazidime-clavulanic acid MIC = 1 μ g/mL).
Reporting			For all confirmed ESBL-producing strains: If laboratories do not use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, the test interpretation should be reported as resistant for all penicillins, cephalosporins, and aztreonam. If laboratories use current cephalosporin and aztreonam interpretive criteria, then test interpretations for these agents do not need to be changed from susceptible to resistant.	

۱-۲۰-۲-۲ روش دیسک سینرژیسیم (Double disk approximation)

(test

ارگانیسیم هایی که دارای مقاوت و یا مقاومت حد واسط به سفالوسپورین های نسل سوم هستند از نظر تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد بررسی قرار می گیرند. برای ای کار دیسک آموکسی سیلین کلاولانیک اسد در مرکز محیط مولر هینتون آگار که ارگانیسیم مورد نظر با کدورت مطابق با محیط ۵/۰ مک فارلند در آن کشت داده شده قرا می گیرد. سپس هر یک از دیسکهای سفنازیدیم و سفوتاکسیم به فاصله ۱/۵ سانتی متری از مرکز دیسک آموکسی سیلین کلاولانیک اسید قرار می گیرند و پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد الگوی هاله عدم رشد آنها ارزیابی می شود.

ایزوله هایی که دارای هاله (نیروی) مهاری به سمت دیسک آموکسی سیلین کلاولانیک اسید هستند تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در نظر گرفته می شوند (۴۶).

۳-۲-۲۰-۱ تست سه بعدی (Three dementional test)

در این تست ارگانیسم بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده می شود، سپس شکافی به صورت عمودی در پلیت ایجاد کرده و یک سفالوسپورین وسیع الطیف به فاصله ۳ میلی متری از شکاف قرار داده می شود و ارگانیسم مورد نظر به داخل شکاف تلقیح می گردد. وجود هاله مهاری در اطراف شکاف به عنوان تست مثبت در نظر گرفته می شود. این تست در شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) حساسیتی به اندازه Double disk approximation test داشته، اما در نحوه انجام تست چالش هایی وجود دارد (۴۷).

۴-۲-۲۰-۱ روش Vitek

سیستم های حساسیت اتوماسیون Vitek برای تعیین ESBLs با استفاده از دیسک های سفنازیدیم و سفوتاکسیم به تنهایی و در ترکیب با اسید کلاولانیک هستند. کاهش لگاریتمی در رشد چاهک حاوی اسید کلاولانیک در مقایسه با چاهک فاقد اسید کلاولانیک نشانه بیان یک ESBLs است (۴۷).

۱-۲۰-۵ روش E-test

از نوارهایی که در یک لبه حاوی سفتازیدیم یا سفوتاکسیم و در لبه دیگر حاوی سفتازیدیم و سفتازیدیم کلاولانیک اسید یا سفوتاکسیم و سفوتاکسیم کلاولانیک هستند، استفاده می‌شود. کاهش بیش از ۳ لگاریتم در MIC سفتازیدیم یا سفوتاکسیم در حضور اسید کلاولانیک به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته می‌شود (۴۷).

۱-۲۱ روش های مولکولی

روش های فنوتیپی توانایی افتراق بین آنزیم های اختصاصی مسئول تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) را ندارند. آزمایشگاه های مرجع از روش های مولکولی برای تشخیص ژن های دخیل در تولید (ESBLs) استفاده می کنند. روش معمول استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) است.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR روش مولکولی دیگری است

که مورد استفاده قرار می گیرد. سکانس های (ERIC PCR) توالیهای تکرار شونده معکوس هستند که حاوی ۱۲۶ جفت باز بوده و در نواحی اکستراژنیک ژنوم باکتری قرار گرفته اند. این روش منجر به کشف گونه های جدید و درک بهتر گونه های شناسایی شده می گردد و نقش مهمی در اپیدمیولوژی، کنترل و پیشگیری از بیماری ایفا می کند. جهت تعیین ساب تایپ های ژن های دخیل در تولید (ESBLs) توالی یابی (Sequencing) صورت می گیرد تا موتاسیون در توالی ژنی مشخص شود.

فصل دوم

بررسی متون

۱-۲ بررسی متون

- در مطالعه ای که توسط بورویس^۸ و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۸ گونه انتروباکتر کلوآکه مقاوم به سفوتاکسیم برای بررسی حضور ژن *bla*_{CTX-M-28} صورت گرفت، ۵ نمونه (۶۲/۵٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} نیز بودند (۴۸٪).
- در مطالعه ای که توسط روکوتورینیا^۹ و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در ماداگاسکار بر روی ۱۴ ایزوله انتروباکتر کلوآکه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) که دارای مقاومت چند دارویی بودند صورت گرفت، ۲ ایزوله انتروباکتر کلوآکه (۱۴/۲۸ درصد) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند (۴۹٪).
- در مطالعه انجام شده توسط لانچل^{۱۰} و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کامرون بر روی ۹ انتروباکتر کلوآکه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs)، همه ایزوله ها انتروباکتر (۱۰۰ درصد) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند (۵۰٪).
- در مطالعه ای که توسط ماکادو^{۱۱} و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در پرتغال بر روی ۱۹ گونه کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی برای بررسی ژن های *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} صورت گرفت، همه نمونه ها (۱۰۰٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند (۵۱٪).

⁸ Bourouis

⁹ Rakotonirina

¹⁰ Lonchel

¹¹ Machado

- در بررسی انجام شده توسط لورنا^{۱۲} و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در برزیل ، در ۵ گونه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بخش آی سی یو، در ۴ نمونه (۸۰٪) علاوه بر ژن *bla*_{KPC-2}، ژن *bla*_{OXA-1} نیز گزارش شد(۵۲).
- در مطالعه ای که توسط توروو^{۱۳} همکارانش در سال ۲۰۱۱ در اسپانیا بر روی ۹۰ گونه سالمونلا انتریکای مقاوم و یا دارای مقاومت حد واسط به آموکسی سیلین کلاولانیک و سفالوسپورین های نسل سوم صورت گرفت ۲۳ ایزوله (۲۵٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بود(۵۳).
- در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط باتاچارجی^{۱۴} و همکارانش در کشور هند بر روی ۳ گونه های اشرشیا کلی جدا شده از بیمارانی که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند صورت گرفت ، هر ۳ نمونه (۱۰۰٪) دارای ژن *bla*_{OXA-2} بودند(۵۴).
- در مطالعه صورت گرفته توسط ژوینینی^{۱۵} و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در بیمارستانی در تونس بر روی ۱۸ گونه اشرشیا کلی تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف ۱۷ نمونه (۹۴/۴٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بود(۵۵).

¹² Lorena

¹³ Toro

¹⁴ Bhattacharjee

¹⁵ Jouini

- در مطالعه انجام شده توسط رویز^{۱۶} و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در فنلاند بر روی ۸ گونه کلبسیلا اکسی توکا برای بررسی حضور ژن ها *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *qnrs1* صورت گرفت همه نمونه ها (۱۰۰٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند (۵۶).
- در مطالعه انجام شده توسط تولماسکای^{۱۷} و همکارانش در سال ۱۹۹۳ بر روی ترانسپوزون ۱۳۳۱ با مقاومت چند گانه، ژن *bla*_{OXA-9} برای اولین بار در کلبسیلا پنومونیه گزارش گردید (۴۰).
- در مطالعه ای که توسط کوبرو^{۱۸} و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در اسپانیا بر روی ۹۸ ایزوله کلبسیلا پنومونیه همه نمونه ها (۱۰۰٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند (۵۷).

¹⁶ Ruiz

¹⁷ Tolmasky

¹⁸ Cubero

فصل سوم

روش کار

۱-۳ جدول متغیرها

جدول ۵: جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پایه	گستره	اسمی	رتبه ای		
مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده						*	براساس نتایج فنوتیپی و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد	حساس/مقاوم یا مقاومت حد واسط)
فنوتیپ ESBL					*		بررسی مقایسه ای افزایش قطر هاله عدم رشد	دارد/ندارد
حضور ژن مولد ESBL تیپ OXA					*		انجام ژل الکتروفورز و بکارگیری ساین مارکهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد
ایزوله های انتروباکتر جداشده از بیمارستان های مختلف					*			قزوین، تهران، کرج
ایزوله های انتروباکتر جداشده از بخش های مختلف					*			اورژانس، آی سی یو، داخلی و...
ایزوله های انتروباکتر جداشده از نمونه ها					*			ادرار، زخم، CSF و...

۲-۳ اهداف و فرضیات

۱-۲-۳ هدف اصلی

فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده تیپ های OXA-1، OXA-2، OXA-9 و OXA-10 در گونه های انتروباکتر جمع آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان های شهرهای قزوین، تهران و کرج به دو روش فنوتیپی و ملکولی.

۲-۲-۳ اهداف فرعی

- تعیین فراوانی گونه های انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش فنوتیپی

.Double Disk Approximation Test

- تعیین فراوانی ژن های مولد bla_{OXA-1} ، bla_{OXA-2} ، bla_{OXA-9} و bla_{OXA-10} در گونه های

انتروباکتر مثبت از نظر فنوتیپی به روش PCR.

- تعیین فراوانی گونه های انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف جداشده از

بیمارستان های مختلف شهرهای قزوین، تهران و کرج.

- تعیین فراوانی گونه های انتروباکتر تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف جداشده از بخش

ها و نمونه های مختلف بیمارستان های شهرهای قزوین، تهران و کرج.

۳-۲-۳ اهداف کاربردی

این مطالعه با شناسایی ژن های مختلف کد کننده فاکتورهای مهم مقاومت دارویی که اغلب برای اولین بار در کشور انجام می پذیرد ضمن نیل به اهداف اپیدمیولوژیک و بررسی وضعیت موجود می تواند در کنترل عفونت های بیمارستانی ناشی از این باکتری های مقاوم و اعمال روش های نوین کنترل ژن های کد کننده آن ها رهنمون سازد.

نوع مطالعه اپیدمیولوژیک توصیفی بوده و معیارهای ورود به مطالعه شامل موارد زیر است :

۱- نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های انتروباکتر مثبت باشد.

و معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

۱- نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آنها سایرباکتری های بجز گونه های انتروباکتر باشد.

۲- ایزوله ای انتروباکتر که از نظر تولید ESBL منفی باشند.

۳- بیمارانی که نمونه های ارسالی آنان تکراری باشد.

۴- نمونه بیماران سرپایی.

۳-۳ جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری

جمعیت مورد مطالعه شامل ایزوله های باکتریایی جدا شده از نمونه های بیولوژیک ارسالی (نظیر: خلط، مایع آسیت، ادرار، مایع نخاع، محل زخم و ...) از بیماران بستری بیمارستان های شهر قزوین، کرج و تهران است.

جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده می شود. با در نظر گرفتن $\alpha=0/05$ ، شیوع ژنهای کد کننده فاکتور مقاومت در بین نمونه های جدا شده انتروباکتر $P=0/72$ و دقت $0/07$ تعداد ۱۵۸ ایزوله تولید کننده بتالاکتاماز با طیف گسترده در نظر گرفته میشود. ایزوله های انتروباکتر جدا سازی شده جهت انجام مراحل تحقیق در فریزر 0°C -۷۰ نگهداری خواهد شد.

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1 - P)}{d^2} = 158$$

که با توجه به محدودیت منابع مالی بر روی ۱۲۱ نمونه کار انجام شد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ایزوله های انتروباکتر تولید کننده بتا لاکتامازهای وسیع الطیف ژنوتیپ های OXA از مجموعه ژنهای بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) در بیمارستان های شهر قزوین، تهران و کرج است.

▪ جمع آوری نمونه

۱۲۱ ایزوله از گونه های مختلف انتروباکتر از نمونه های بالینی ادرار، خون، زخم، خلط، تراشه، مایع مغزی- نخاعی مایع مفصل و مایع پلور از بخش های مختلف بیمارستان های شهر های قزوین، تهران و کرج جمع آوری شدند.

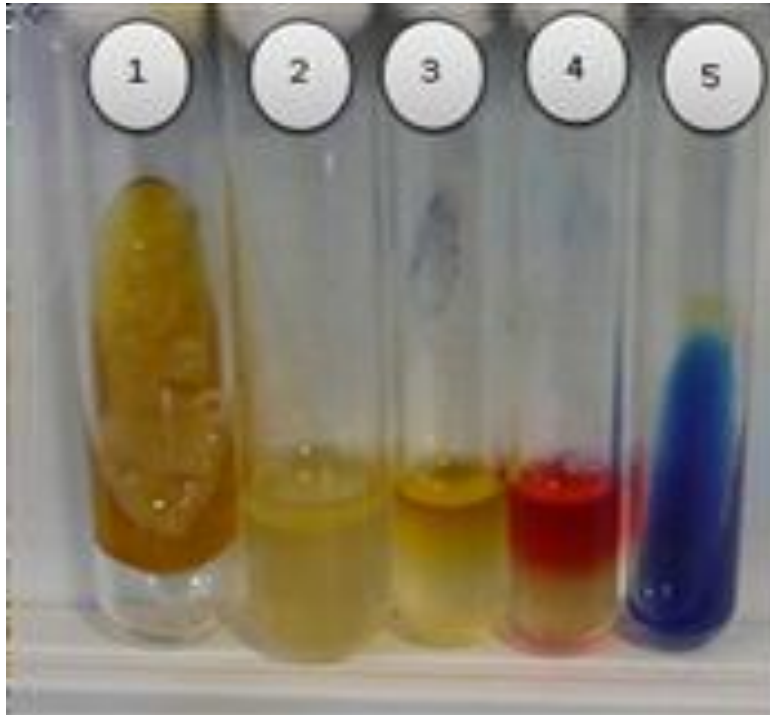
۳-۴ تست های بیوشیمیایی :

برای اطمینان از نوع باکتری مورد نظر و بررسی دقیق تر ابتدا باکتری بر روی محیط های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شدند و سپس از تست های بیوشیمیایی جهت تعیین هویت استفاده شد که شامل موارد زیر بودند :

- رنگ آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی
- انجام تست کاتالاز و اکسیداز
- کشت بر روی محیط های افتراقی TSI، لایزین آیرون آگار، سیمون سیترات ، اوره آگار، SIM جهت بررسی اندول، حرکت و سولفید هیدروژن، MR-VP.

گونه های انتروباکتر باسیل های گرم منفی ،کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند که تست حرکت و ووگس پروسکائر در همه گونه ها مثبت ، اندول و تولید گاز سولفید هیدروژن در همه گونه ها منفی و سایر تست ها با توجه به نوع گونه متغیر می باشد. پس از اطمینان از نوع باکتریایی جدا شده جهت نگهداری طولانی مدت ایزوله ها مقداری کلنی را در ویال حاوی محیط TSB به اضافه ۱۰-۱۵ درصد

گلیسرول حل کرده و ویال را به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از مدت زمان ذکر شده در صورت رشد باکتری و ایجاد کدورت در محیط، ویال ها به فریزر ۲۰- سانتیگراد منتقل شدند.



شکل ۵: واکنش های بیوشیمیایی جنس انتروباکتر، لوله ۱: محیط TSI واکنش اسید / اسید با تولید گاز، لوله ۲: محیط SIM؛ کدورت پخش شده نشانه ی تحرک مثبت و قرمز نشدن در مجاورت معرف کواکس نشانه نتیجه تست اندول منفی. لوله ۳: واکنش MR منفی. لوله ۴: واکنش VP مثبت، لوله ۵: واکنش سیترات مثبت در محیط سیمون سیترات است.

۵-۳ انجام تست غربالگری ESBLs به روش Disk Agar Diffusion

ایزوله های جمع آوری شده از نظر تولید این آنزیم با استفاده از روش Disk Agar Diffusion مطابق دستورالعمل CLSI به شرح زیر غربالگری شدند.

❖ لوازم و مواد مورد نیاز :

- محیط MHA (ضمیمه ۱)
- محیط ۵٪ مک فارلند (ضمیمه ۲)
- سرم فیزیولوژی استریل
- سواب استریل
- دیسک های آنتی بیوتیک خریداری شده از شرکت MAST انگلستان شامل :
سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$)، سفتازیدیم ($30\mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$)، سفپودوکسیم ($30\mu\text{g}$)،
آزترئونام ($30\mu\text{g}$).

❖ روش کار :

ابتدا اقدام به تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه (۲۴ ساعته) باکتری مورد نظر در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل مطابق با کدورت محیط ۰/۵ مک فارلند کرده و پس از آگیری سواب با فشار به دیواره لوله بر روی محیط MHA در سه زاویه 45° کشت را انجام می دهیم. بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه و جذب سوسپانسیون در محیط اقدام به قرار دادن دیسک ها روی محیط می نمائیم به

گونه ای که تعداد دیسک ها متناسب با اندازه پلیت باشد دیسک ها را به فاصله ۱/۵ سانتی متری از لبه پلیت و فاصله ۲ سانتی متری از دیسک کناری قرار می دهیم و بعد پلیت را در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و بعد ۲۴ ساعت اقدام به اندازه گیری قطر هاله عدم رشد می نمائیم. طبق توصیه CLSI ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد دیسک سفتازیدیم ($30\mu g$) ≥ 22 میلی متر، دیسک سفتریاکسون ($30\mu g$)، دیسک سفوتاکسیم ($30\mu g$)، دیسک سفودوکسیم ($30\mu g$) ≥ 27 میلی متر و دیسک آزترئونام ($30\mu g$) ≥ 25 میلی متر باشد به عنوان ارگانسیم بالقوه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف بوده و باید تست تائیدی برای این ایزوله ها صورت گیرد.

۳-۶ تایید تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف به روش دیسک ترکیبی

در کنار هر یک از دیسک های ذکر شده اقدام به گذاشتن دیسک ترکیبی حاوی مهارکننده می کنیم. مثلا در کنار دیسک سفوتاکسیم از دیسک سفوتاکسیم ($30\mu g$) و کلاولانیک اسید ($10\mu g$) استفاده می کنیم. در صورتیکه اختلاف قطر هاله عدم رشد ۲ دیسک بزرگتر یا مساوی ۵ میلیمتر باشد نشانه تولید آنزیم ESBLs می باشد که توسط مهارکننده موجود در دیسک حاوی کلاولانیک اسید مهار شده و در نتیجه هاله عدم رشد بزرگتری را ایجاد کرده است (۴۵).

۳-۷ تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

برای انجام آزمون از دستور العمل موسسه بین المللی استاندارد های آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد و به شرح زیر انجام شد.

۱- ابتدا محیط مولر هیتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند.

۲- در مرحله ی بعد، ظروف حاوی دیسک های آنتی های سیپروفلوکساسین، نور فلوکساسین، گتی فلوکساسین، آمیکاسین، تتراسیکلین، کلرامفنیکل و ایمی پنم برای انجام آزمون، از فریزر 20°C - (نگهداری بلند مدت) به یخچال 4°C (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳- در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد استفاده می شود، لذا نمونه ها یک روز قبل از انجام آنتی بیوگرام بر روی محیط ژلوز ساده کشت داده شدند. سپس در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزانی از کلونی را به لوله حاوی ۲ ml سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و بعد از مخلوط کردن با میکسر، کدورت سوسپانسیون به دست آمده با کدورت نیم مک فارلند (ضمیمه ۱) تطبیق داده شد.

۴- با استفاده از یک سواب کتان استریل سوسپانسیون را بر روی محیط مولر هیتون آگار تهیه شده به روش چمنی کشت داده شد. پانزده دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی ذکر شده که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۱ سانتی متر از یکدیگر و هم چنین از لبه پلیت قرار دادیم.

۵- پس از قرار دادن دیسک‌ها پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطرهای عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج مربوطه در فرم‌های تهیه شده وارد شدند.

۳-۸ انجام آزمون واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) جهت شناسایی ژن‌های

مولد $bla_{\text{OXA-1}}$ ، $bla_{\text{OXA-2}}$ ، $bla_{\text{OXA-9}}$ و $bla_{\text{OXA-10}}$

برای تعیین بتالاکتامازهای وسیع الطیف تیپ‌های $bla_{\text{OXA-1}}$ ، $bla_{\text{OXA-2}}$ ، $bla_{\text{OXA-9}}$ و $bla_{\text{OXA-10}}$ از پرایمرهایی با مشخصات موجود در جدول (۶) استفاده شد. جهت حضور و یا عدم حضور ژن‌ها از الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز استفاده گردید.

جدول ۶: پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR

ژن	سایز (bp)	توالی پرایمر	رفرنس
<i>bla</i> _{OXA-1}	۸۱۳	F: 5-ACA CAATACATATCAACTTCG C -3 R: 5-AGT GTGTTTAGAATGGTGATC -3	۵۸
<i>bla</i> _{OXA-2}	۶۵۱	F: 5-TTC AAGCCA AAGGCACGATAG-3 R: 5-TCC GAGTTGACTGCCGGGTTG-3	۵۸
<i>bla</i> _{OXA-9}	۶۵۱	F: 5-CGTCGCTCACCATATCTCCC-3 R: 5-CCTCTCGTGCTTTAGACCCG-3	۵۹
<i>bla</i> _{OXA-10}	۸۱۳	F: 5-CGT GCTTTGTAAAAGTAGCAG-3 R: 5-CAT GATTTTGGTGGGAATGG-3	۵۸

❖ مراحل انجام آزمون مولکولی

- استخراج DNA
- آماده سازی پرایمر
- انجام آزمون PCR
- الکتروفورز محصولات

▪ مواد لازم جهت استخراج DNA:

- میکروتیوپ ۱/۵ سی سی
- آب مقطر استریل
- شیکر
- بن ماری
- میکروسانتریفوژ
- سمپلر - سر سمپلر

۱-۸-۳ استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. بدین منظور نیاز به کشت تازه ای از باکتری ها داشتیم. بنابراین ابتدا باکتری های ذخیره شده را پاساژ داده و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس چند کلنی از باکتری را در ویال اپندورف ۱/۵ سی سی که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بود حل کرده و با استفاده از شیکر کاملاً مخلوط شدند تا محلولی با کدورت یکنواخت تهیه شود. سپس ویالها را برای مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از مدت زمان ذکر شده ویال ها در دستگاه میکروسانتریفوژ قرار گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتیفریوژ شدند و

سپس محلول رویی این ویال ها به ویال های جدید استریل منتقل شدند تا برای آزمون PCR مورد استفاده قرار گیرند.

۲-۸-۳ آماده سازی پرایمر

پس از دریافت پرایمرها به صورت لیوفیلیزه از شرکت مطابق برگه دستورالعمل پرایمر اقدام به تهیه یک محلول ذخیره برای هر یک پرایمرهای Forward و Reverse شد. غلظت نهایی هر یک از پرایمرها $100 \mu\text{mol}$ است. سپس هر یک از ویال ها تا زمان مصرف در فریزر -20 درجه سانتی گراد ذخیره شدند. بسته به کار روزانه برای تهیه محلول پرایمر با غلظت $10 \mu\text{mol}$ از هر دو رشته فوروارد و ریورس تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

▪ مواد لازم جهت آزمون PCR:

- میکروتیوپ $1/5$ و $0/5$ سی سی
- آب مقطر استریل
- سمپلر - سرسمپلر
- ترموسایکلر
- Mastermix
- پرایمر Forward با غلظت $10 \mu\text{mol}$

○ پرایمر Reverse با غلظت $10\mu\text{mol}$

○ Taq polymerase

○ DNA template

مواد لازم جهت ساخت Mastermix از شرکت ژن فن آوران تهیه شد. با توجه به اینکه حجم

نهایی واکنش PCR در این مطالعه ۲۵ میکرولیتر است مقادیر مورد نیاز جهت تهیه

Mastermix در جدول (۷) آمده است:

جدول ۷: مقادیر بهینه برای تهیه Mastermix یک واکنش PCR

حجم (میکرولیتر)	ترکیب
۲	dNTP mix 10 mmol
۱۰	PCR Buffer 10x
۳	MgCl ₂ 50 mmol
۷۳	DW

۳-۸-۳ آماده سازی واکنش PCR :

حجم پرایمرها ، DNA الگو و آنزیم پلیمراز مورد استفاده که به Mastermix جهت انجام

واکنش اضافه می شوند، به شرح ذیل در جدول (۸) آمده است:

جدول ۸: مواد مولکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
Mastermix	۲۱/۷۵
Forward primer	۱
Reverse primer	۱
DNA Template	۱
Taq polymerase 5 u/μl	۰/۲۵

• برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems:

پس از آماده سازی مواد هر یک از ویال ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. مشخصات سیکل و

شرایط دمایی و زمان هر یک از ژن ها در جدول (۹) آمده است.

جدول ۹: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در واکنش PCR برای ژن های مورد نظر

ژن	جداسازی اولیه	جداسازی	Anealing	دمای extension	Extension نهایی
<i>bla</i> _{OXA-1}	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه
<i>bla</i> _{OXA-2}	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۷ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه
<i>bla</i> _{OXA-9}	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۷ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه
<i>bla</i> _{OXA-10}	۹۶ درجه یک دقیقه	۹۶ درجه یک دقیقه	۵۲ درجه یک دقیقه	۷۲ درجه ۱۰ دقیقه	۷۲ درجه یک دقیقه

۴-۸-۳ الکتروفورز محصولات PCR:

▪ مواد مورد نیاز:

- پودر آگارز
- TBE 10x buffer (Tris HCL-Boric acid – EDTA) (ضمیمه ۳)
- TBE 1x buffer (Tris HCL-Boric acid – EDTA) (ضمیمه ۴)
- Ladder marker
- Loading buffer
- سایر گرین

○ سینی ژل

○ شانه ژل

○ تانک الکتروفورز

○ منبع تغذیه الکتریکی

○ سمپلر - سرسمپلر

○ دستگاه ژل داک

روش انجام الکتروفورز:

○ محلول TBE 1X را حرارت داده و پس از خنک شدن ۱ میکرولیتر (10 µg/ml)

سایبر گرین (برای رنگ آمیزی DNA) را به آن اضافه می نماییم. سپس محلول آماده

شده را در سینی ژل حاوی شانه با فواصل معین می ریزیم تا کاملاً "سرد و سفت شود.

سپس ژل را به تانک الکتروفورز منتقل کرده و تانک را با محلول TBE 1X پر می کنیم.

با استفاده از سمپلر ۷ میکرولیتر از محصول را با ۳ میکرولیتر Loading Buffer 6 X

مخلوط کرده و درچاهک می ریزیم. سپس دستگاه را در ولتاژ ۱۰۰ ولت تنظیم کرده پس

از اینکه نمونه ۲/۳ طول ژل را طی کرد اقدام به برداشتن ژل و انتقال به دستگاه ژل داک

می نماییم و در زیر لامپ UV باندهای ایجاد شده را مشاهده و بررسی می کنیم.

۹-۳ تعیین توالی (sequencing)

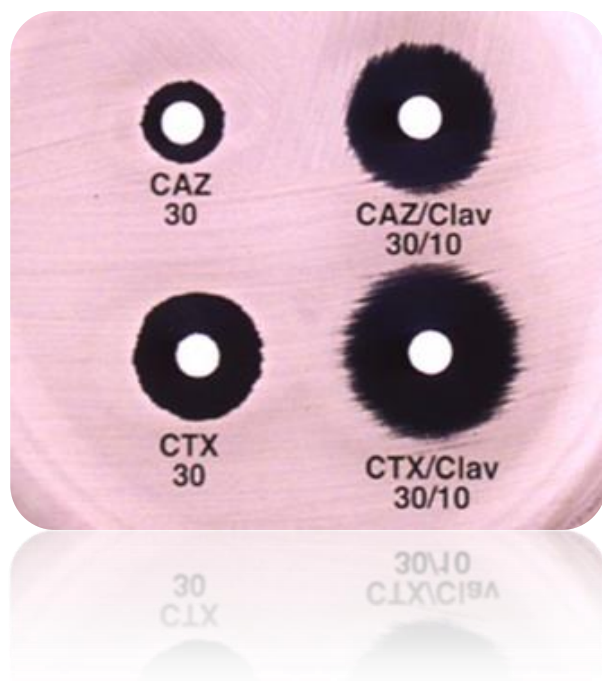
محصول PCR برای ژن *blaOXA-1* از نظر تایید حضور ژن توسط شرکت ژن فن اوران به شرکت MacroGene (کره جنوبی) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی با نرم افزار Choromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI، blast شده و با ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

فصل چهارم

یافته‌ها

۱-۴ جمع آوری نمونه:

تعداد ۱۲۱ ایزوله انتروباکتر از بیمارستان های شهرهای قزوین، تهران و کرج جمع آوری شد و مجددا در آزمایشگاه میکروبیشناسی دانشکده پزشکی توسط آزمون های استاندارد میکروبیشناسی تأیید شدند. ایزوله ها برای بررسی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) ابتدا با استفاده از دیسک های سفوتاکسیم ($30\mu\text{g}$)، سفنازیدیم ($30\mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$)، سفپودوکسیم ($30\mu\text{g}$) و آزترئونام ($30\mu\text{g}$)، غربالگری شده و سپس به روش دیسک ترکیبی (combined disk) مورد تأیید قرار گرفتند.



شکل ۶: تست فنوتیپی تأییدی تولید بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) بر روی ایزوله های انتروباکتر به روش دیسک

ترکیبی

۲-۴ الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی نمونه های ESBLs

نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک अगर دیفیوژن (DAD) طبق دستورالعمل موسسه استاندارد روش های آزمایشگاهی (CLSI) برای آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، نور فلوکساسین، گتی فلوکساسین، آمیکاسین، تتراسیکلین، کلرامفنیکل و ایمی پنم در جدول (۱۰) آمده است. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت مربوط به جنتامایسین (۹۴٪/۷۷/۷) و سپس تتراسیکلین (۸۳٪/۶۸/۶) می باشد و کمترین میزان مقاومت نسبت به گتی فلوکساسین (۲۶٪/۲۱/۵) و ایمی پنم (۱۰٪/۸/۳) مشاهده شد.

جدول ۱۰: الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

نام دیسک	مقاوم (٪)	حساس (٪)	حد واسط (٪)
جنتامایسین	۹۴٪/۷۷/۷)	۲۶٪/۲۱/۵)	۱)/۸)
سیپروفلوکساسین	۶۶٪/۵۴/۵)	۵۴٪/۴۴/۶)	۱)/۸)
نور فلوکساسین	۴۳٪/۳۵/۵)	۷۶٪/۶۲/۸)	۲٪/۱/۷)
گتی فلوکساسین	۲۶٪/۲۱/۵)	۹۵٪/۷۸/۵)	۰
آمیکاسین	۴۲٪/۳۴/۷)	۷۷٪/۶۳/۶)	۲٪/۱/۷)
تتراسیکلین	۸۳٪/۶۸/۶)	۳۷٪/۳۰/۶)	۱)/۸)
کلرامفنیکل	۶۷٪/۵۵/۴)	۵۳٪/۴۳/۸)	۱)/۸)
ایمی پنم	۱۰٪/۸/۳)	۱۱۱٪/۹۱/۷)	۰

در این مطالعه ۶۸ ایزوله (۵۶/۲٪) از مردان و ۵۳ ایزوله (۴۳/۸٪) از زنان جداسازی شدند که ۸۹ ایزوله

(۷۳/۶٪) مربوط به شهر تهران بودند و ۲۷ ایزوله (۲۲/۳٪) از شهر قزوین و ۵ ایزوله (۴/۱٪) از کرج جدا

شدند. تعداد نمونه ها به تفکیک شهر، بیمارستان و جنس در جدول (۱۱) و (۱۲) آمده است.

جدول ۱۱: فراوانی ایزوله های انتروباکتر جمع آوری شده به تفکیک شهر و بیمارستان

شهر	تهران						قزوین						کرج		
بیمارستان فراوانی	نوعی	قدسی	کوتی	رجی	ولایت	رازی	امام خمینی	سینا	فیاض بخش	امام حسین	بقیه الله	شریعتی	باهنر	شهید	
تعداد ایزوله های جدا شده	۴	۵	۶	۴	۲	۶	۴۲	۲۲	۸	۱	۱۳	۳	۵		
درصد ایزوله های جدا شده	۳/۳	۴/۱	۵	۳/۳	۱/۷	۵	۳۴/۷	۱۸/۲	۶/۶	۰/۸	۱۰/۷	۲/۵	۱/۴		
تعداد کل ایزوله های جدا شده	۲۷						۸۹						۵		
درصد کل ایزوله های جدا شده	۲۲/۳						۷۳/۶						۱/۴		
تعداد کل	۱۲۱														

جدول ۱۲: فراوانی ایزوله های انتروباکتر جدا شده بر اساس جنسیت

جنس فراوانی	زن	مرد
تعداد ایزوله های جدا شده	۶۸	۵۳
درصد ایزوله های جدا شده	۵۶/۲	۴۳/۸
تعداد کل	۱۲۱	

همانطور که در جدول (۱۳) و (۱۴) آمده است، ایزوله های انتروباکتر جمع آوری شده غالباً از بیماران بستری در بخش مراقبت های ویژه (۵/۵۴٪) و داخلی (۵/۱۶) و از نمونه های بالینی ادرار (۲/۳۲٪) و زخم (۴/۲۶٪) جداسازی شدند.

جدول ۱۳: فراوانی ایزوله های انتروباکتر جدا شده از بخش های مختلف

بخش فراوانی	مراقبت ویژه	افصل	ک	فوقانی	ارتوپد	داخلی
تعداد ایزوله های جدا شده	۶۶	۷	۱۰	۹	۹	۲۰
درصد ایزوله های جدا شده	۵۴/۵	۵/۸	۸/۳	۷/۴	۷/۴	۱۶/۵
تعداد کل	۱۲۱					

جدول ۱۴: فراوانی ایزوله های انتروباکتر جدا شده بر اساس نوع نمونه های بالینی جدا شده از بیماران

نوع نمونه / فراوانی	ژن	فیلد	ژن	رایج مغزی نخاعی	لاواژ پرونش	ادرار	تراشه
تعداد ایزوله های جدا شده	۳۲	۷	۱۷	۲	۲	۳۹	۲۲
درصد ایزوله های جدا شده	۲۶/۴	۵/۸	۱۴	۱/۷	۱/۷	۳۲/۲	۱۸/۲
تعداد کل	۱۲۱						

۳-۴ نتایج جداسازی ژن های کد کننده bla_{OXA-9} ، bla_{OXA-2} ، bla_{OXA-1}

و bla_{OXA-10}

با استفاده از آزمون PCR فراوانی ژن های bla_{OXA-1} ، bla_{OXA-2} ، bla_{OXA-9} و bla_{OXA-10}

بر روی ایزوله های انتروباکتر سنجیده شد. در بین ژن های ذکر شده ژن bla_{OXA-1} در

۵۹/۵٪ از ایزوله ها مثبت بود و بیشترین فراوانی این ژن در میان نمونه های بالینی

زخم (۳۳/۳٪) و تراشه (۲۲/۲٪) مشاهده شد که این نتایج در جدول (۱۵)، (۱۶) و (۱۷)

آورده شده است.

جدول ۱۵: فراوانی ژن های بتالاكتامازهای وسیع الطیف تیپ های OXA-1، OXA-2، OXA-9 و OXA-10

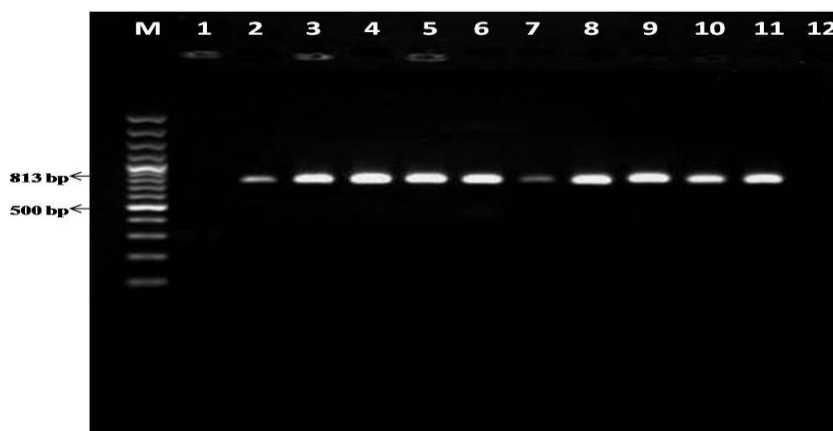
ژن	تعداد ایزوله های مثبت	درصد ایزوله های مثبت
<i>bla</i> _{OXA-1}	۷۲	۵۹/۵٪
<i>bla</i> _{OXA-2}	۰	۰٪
<i>bla</i> _{OXA-9}	۰	۰٪
<i>bla</i> _{OXA-10}	۰	۰٪

جدول ۱۶: فراوانی ژن های بتالاكتاماز وسیع الطیف تیپ OXA-1 بر اساس نوع نمونه های بالینی جدا شده از بیماران

نوع نمونه / فراوانی							تراشه
ژن	غلظت	ژن	نوع مغزی نخاعی	لاواژ برونش	ادرار	۱۶	
۲۴	۳	۱۱	۲	۱	۱۵	۱۶	
۳۳/۳	۴/۲	۱۵/۳	۲/۸	۱/۴	۲۰/۸	۲۲/۲	
تعداد کل							۷۲

جدول ۱۷: فراوانی بتالاکتاماز وسیع الطیف تیپ OXA-1 جدا شده از بخش های مختلف

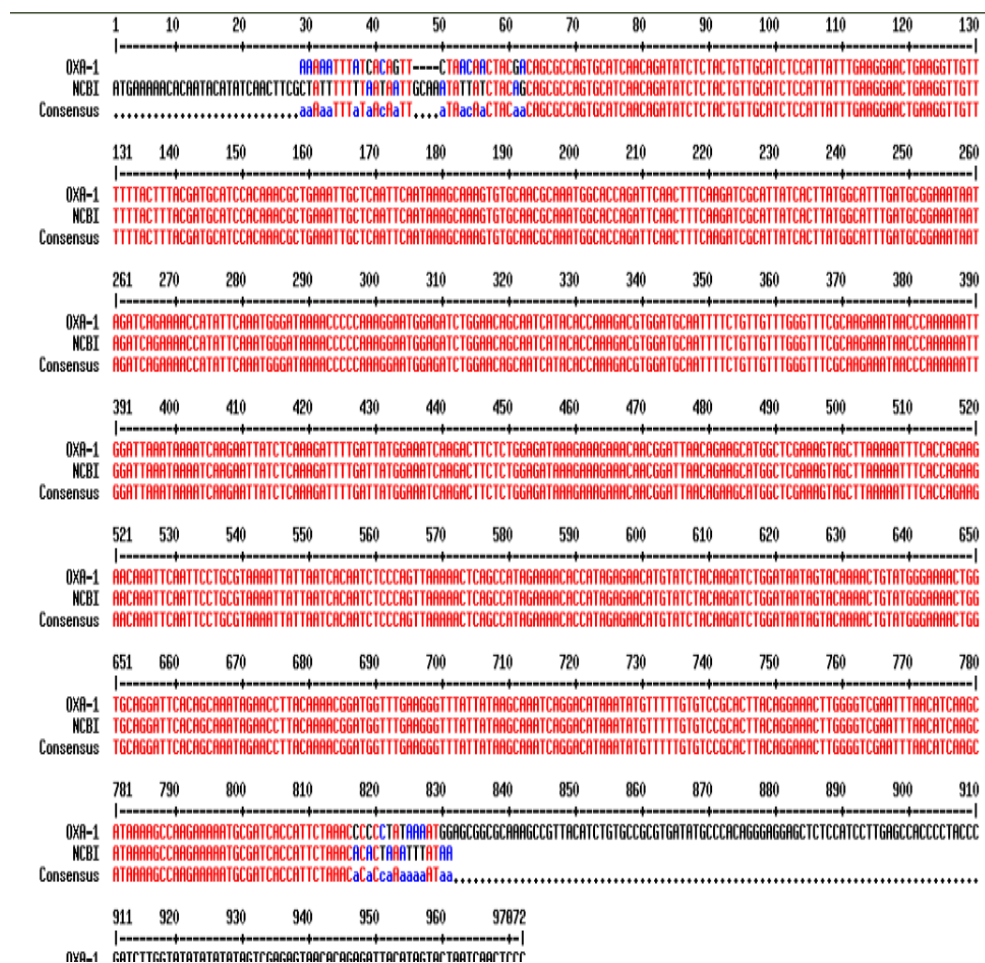
بخش فراوانی	مراقبت ویژه	اعصاب	جراحی	عفونی	ارتوپد	داخلی
تعداد ایزوله های جدا شده	۳۵	۷	۷	۷	۷	۹
درصد ایزوله های جدا شده	۴۸/۶	۹/۷	۹/۷	۹/۷	۹/۷	۱۲/۵
تعداد کل	۷۲					



شکل (۷): محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{OXA-1}: ستون M: DNA مارکر، ستون ۱: ایزوله بالینی منفی (اشرشیا کلی ATCC25922) ستون های ۲ تا ۱۱: ایزوله های مثبت بالینی، ستون ۱۲: واکنش PCR بدون DNA الگو

۴-۴ نتایج آزمون Sequencing:

نتایج تعیین توالی محصولات PCR ژن های مورد مطالعه نشان داد که توالی های مورد بررسی بعد از blast از یکسانی و تشابه توالی بالایی برخوردار بودند. نتایج alignment ژن های *bla*_{OXA-1} ژن های سویه های استاندارد ثبت شده در NCBI در شکل (۸) آورده شده است.



شکل ۸: نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *bla*_{OXA-1}

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث

در میان خانواده انتروباکتریاسه، گونه‌های انتروباکتر شایع‌ترین پاتوژن‌هایی هستند که می‌توانند در افراد بستری در بیمارستان به‌خصوص در افراد دارای نقص ایمنی و یا افرادی که از تجهیزات تنفسی استفاده می‌کنند، باعث عفونت فرصت طلب شوند (۶۰). آمارهای اخیر نشان دهنده این است که آنها شایع‌ترین ارگانیسم‌های گرم منفی در میان عفونت خون و سومین پاتوژن شایع در پنومونی در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) هستند (۶۱).

گونه‌های انتروباکتر به‌خصوص انتروباکتر آئروجنز و انتروباکتر کلوآکه با عفونت‌های بیمارستانی مرتبط بوده و پاتوژن فرصت طلب در نظر گرفته می‌شوند و به ترتیب مسئول ۶۵/۷۵ درصد و ۱۵/۲۵ درصد عفونت‌های انتروباکتر هستند. گونه‌های انتروباکتر به‌طور عمده در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) یافت شده و مسئول ۸/۶ درصد عفونت‌های بیمارستانی براساس گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) است (۲۰). گونه‌های انتروباکتر تا سال ۱۹۷۰ به‌عنوان عفونت‌های بیمارستانی مطرح نبودند، با این حال در دهه‌های اخیر باکتری‌می ناشی از انتروباکتر اکتسابی از بیمارستان به‌خصوص در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU) در حال افزایش است (۱۹). گونه‌های انتروباکتر نسبت قابل توجهی از موارد باکتری‌می گزارش شده را نیز دربرمی‌گیرند. در یک بیمارستان نوزادان آنها مسئول ۱۴ درصد موارد باکتری‌می هستند، درحالی‌که در بالغین ۱/۵ تا ۶ درصد موارد باکتری‌می را تشکیل می‌دهند (۲۰).

علاوه بر این مقاومت به داروهای ضد میکروبی در میان گونه‌های جنس انتروباکتر در حال افزایش است. یکی از مکانیسم‌های مقاومت در میان انتروباکتریاسه تولید بتالاکتام‌های وسیع الطیف است که باعث غیرفعال شدن سفالوسپورین‌های نسل سوم، مونوباکتام‌ها و پنی سیلین‌ها می‌شوند. اثرشیاکلی و کلبسیلا مهمترین باکتری‌های تولید کننده بتالاکتام‌های وسیع الطیف (ESBLs) هستند، با این وجود سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه مثل گونه‌های انتروباکتر نیز چنین مقاومتی را نشان می‌دهند.^{۱۹} NNIS میزان مقاومت سفالوسپورین‌های نسل سوم در عفونت‌های ناشی از گونه‌های انتروباکتر را در بخش ICU از ژانویه ۱۹۹۹ تا دسامبر ۱۹۹۹، ۳۴ درصد گزارش کرده است.

ایزوله‌های انتروباکتر ممکن است ابتدا به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در *in vitro* حساس باشند، اما گسترش مقاومت در طول درمان به دلیل تولید بتالاکتاماز اتفاق می‌افتد. میزان مقاومت به سفالوسپورین‌های نسل سوم به‌طور میانگین در ۱۰ درصد بیماران دریافت کننده آنتی بیوتیک و ۲۰ درصد بیماران تحت درمان با سفالوسپورین‌های نسل سوم گزارش شده است (۶۲).

بتالاکتام‌های وسیع الطیف تیپ های CTX-M, SHV, TEM از فراوان ترین آنزیم‌های دخیل در بروز این تیپ از مقاومت می‌باشند. در عین حال تیپ‌های دیگر از این آنزیم‌ها از جمله VEB, OXA, PER نیز در مطالعات اخیر گزارش شده اند (۶۳).

^{۱۹} National Nosocomial Infection Surveillance System

لازم به ذکر است که در ایران مطالعات زیادی روی گونه‌های انتروباکتر انجام نشده است و بیشتر مطالعات انجام شده، روی سایر گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه صورت گرفته است. این مطالعه برای اولین بار حضور ژن های *bla*_{OXA-1} را در میان ایزوله های انتروباکتر جدا شده از ایران را نشان می دهد

در این مطالعه در مجموع، ۱۲۱ ایزوله انتروباکتر تولید کننده ESBLs از مراکز بیمارستانی وابسته به دانشگاه‌های علوم پزشکی قزوین، تهران و کرج جمع آوری شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوله‌های انتروباکتر تولید کننده ESBLs غالباً از نمونه‌های بالینی ادرار (۳۲/۲٪) و زخم (۲۶/۴٪)، تراشه (۱۸/۲٪) و خون (۱۴٪) بودند که به ویژه بر نقش مهم عفونت های ناشی از این ارگانیزم به واسطه استفاده از ابزار های تهاجمی از جمله سوند های ادراری ، کاتتر های وریدی و تراشه تاکید دارد. همچنین در این مطالعه اکثر ایزوله های انتروباکتر از بخش‌های مراقبت های ویژه (۵۴/۵٪) و داخلی (۱۶/۵٪) جدا شدند. بنظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، بکار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی مثل تراشه و کاتتر، مواجهه بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف از دلایل عمده شیوع ارگانیزم های مقاوم باشد و در مقایسه با نتایج اکثر مطالعات انجام شده در این زمینه همخوانی دارد.

لازم به ذکر است که یکی از علل پیدایش انواع مقاوم تولید کننده ESBLs، مصرف بیش از حد و طولانی مدت سفالوسپورین‌های وسیع الطیف می‌باشد که براساس بسیاری از گزارش‌ها، شیوع این ارگانیزم‌ها از طریق به‌کارگیری روش‌های کنترل عفونت و محدود کردن استفاده از اکسی ایمینو

سفالوسپورین‌ها کاهش می‌یابد (۶۴ و ۶۵). مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری‌ها از سال‌های دور یکی از مشکلات بهداشتی- درمانی در سطح دنیا بوده است. بیماران بستری در بخش‌های بیمارستانی از جمله بخش ICU بیشتر از سایر بخش‌ها مستعد پذیرش و ابتلا به ارگانیزم‌های تولید کننده بتالاکتامازها می‌باشند. بیماران بستری در این بخش‌ها به سبب شرایط خاص و تضعیف شده‌ای که دارند و با توجه به راهکارهای تهاجمی که برای درمان آنها در نظر گرفته می‌شود، غالباً مستعد آلودگی با ارگانیزم‌های مولد انواع بتالاکتامازها هستند (۶۶).

افزایش تعداد گزارش‌ها در باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، نگرانی عمده‌ای است، زیرا این داروها غالباً گزینه اول برای درمان عفونت‌های باکتریال هستند. عفونت ناشی از ارگانیزم‌های مقاوم باعث مرگ و میر بالاتر، بستری طولانی مدت‌تر و افزایش هزینه در مقایسه با ارگانیزم‌های حساس می‌شود. تعیین و شناسایی باکتری‌های تولید کننده ESBLs در نمونه‌های بالینی در درمان بسیار مهم است، زیرا امکان انتخاب درمان مؤثرتری را برای پزشکان فراهم می‌کند (۶۲).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در برزیل جنوبی توسط نوگوریا^{۲۰} بر روی ایزوله‌های انتروباکتر جدا شده از کشت خون صورت گرفت، ۲۰ درصد ایزوله‌ها از نظر تولید ESBL مثبت بودند (۶۷). در مطالعه انجام شده توسط وادکار^{۲۱} در سال ۲۰۱۳ در هند بر روی ایزوله‌های انتروباکتریاسه که از نظر تولید ESBL مثبت بودند، ۳۳/۳ درصد از ایزوله‌ها متعلق به جنس انتروباکتر بودند. در مطالعه‌ای که بر

²⁰ Nogueira

²¹ Wadkar

روی ایزوله‌های ESBLs مثبت، توسط Chai در سال ۲۰۰۷ در کره صورت گرفت، ۱۲/۸ درصد از ایزوله‌ها، انتروباکتر بودند (۶۸).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط موردی^{۲۲} و همکارانش در نیجریه بر روی ۱۰۷ ایزوله انتروباکتر صورت گرفت، ۷۱ درصد ایزوله‌های انتروباکتر از نمونه زخم، ۶۱ درصد از نمونه ادرار، ۱۷ درصد از نمونه خون و ۱ درصد از CSF (مایع مغزی- نخاعی) جدا شدند که با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت (۶۹).

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ توسط امین^{۲۳} و همکارانش در پاکستان، فراوانی ایزوله‌های انتروباکتر کلوآکه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) ۱۴/۹۳ درصد گزارش شد که ۶۳ درصد از موارد کشت خون مثبت را تشکیل می‌داد و در مقایسه با مطالعه حاضر از فراوانی بیشتری در میان نمونه‌های کشت خون (۱۴٪) برخوردار بود (۴۳).

در مطالعه‌ای که توسط آسنزیو^{۲۴} و همکاران در اسپانیا طی سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۱۰ بر روی اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و گونه‌های انتروباکتر صورت گرفت، ۱۶/۱۸ درصد ایزوله‌ها مربوط به جنس انتروباکتر بود که ۷۲ درصد ایزوله‌های انتروباکتر را انتروباکتر کلوآکه و ۱۸ درصد را انتروباکتر آئروجنز تشکیل می‌داد و بالاترین میزان شیوع گونه‌های انتروباکتر مربوط به بخش نوزادان و ICU (۳۲/۴ درصد) بود که با مطالعه ما نیز هم‌خوانی داشت (۶۰).

²² Mordi

²³ Amin

²⁴ Asensio

در این مطالعه فراوانی ژن های *bla*_{OXA-1} و *bla*_{OXA-2} و *bla*_{OXA-9} و *bla*_{OXA-10} در ایزوله های انتروباکتر تولید کننده ESBLs با استفاده از آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفت که در این میان تنها ژن *bla*_{OXA-1} مثبت بود و فراوانی آن ۵/۵۹٪ گزارش گردید.

در مطالعه ای که توسط روکوتورینیا^{۲۵} و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در ماداگاسکار بر روی انتروباکتریاسه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) که دارای مقاومت چند دارویی بودند صورت گرفت، فراوانی ژن *bla*_{OXA-1} در میان ایزوله انتروباکتر کلوآکه، ۱۴/۲۸ درصد بود که فراوانی پایین تری نسبت به مطالعه حاضر داشت (۴۹٪). در مطالعه انجام شده توسط لانچل^{۲۶} و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کامرون بر روی ۹ ایزوله انتروباکتر کلوآکه تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs)، همه ایزوله ها (۱۰۰درصد) دارای ژن *bla*_{OXA-1} بودند که در مقایسه با مطالعه ما از فراوانی بالاتری برخوردار بود (۵۰٪). در مطالعه ای که توسط بورویس^{۲۷} و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۸ گونه انتروباکتر کلوآکه مقاوم به سفوتاکسیم برای بررسی حضور ژن *bla*_{CTX-M-28} صورت گرفت ۵ نمونه (۶۲/۵٪) دارای ژن *bla*_{OXA-1} نیز بودند که در مقایسه با مطالعه ما ژن *bla*_{OXA-1} از شیوع بالاتری برخوردار بود (۴۸٪).

²⁵ Rakotonirina

²⁶ Lonchel

²⁷ Bourouis

۵-۲ نتیجه گیری :

شیوع بالای سویه های انتروباکتر تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) حاوی ژن *bla_{OXA}* در این مطالعه به عنوان یک مسئله مهم در بیمارستان ها مطرح بوده که مشکلات جدی را برای کنترل عفونت و درمان آنتی بیوتیکی ایجاد می کند. در میان فاکتورهایی که می توانند باعث کاهش بیماری و مرگ و میر در عفونت های تهاجمی ناشی از باسیل های گرم منفی شوند، اولین عامل انتخاب یک آنتی بیوتیک مناسب است. بنابراین برای پیشگیری از گسترش سویه های مقاوم، شناسایی به موقع و درمان قطعی با آنتی بیوتیک های مناسب می تواند کمک کننده باشد و هزینه های ناشی از بستری طولانی مدت و همچنین مرگ و میر را در بیماران کاهش دهد.

پیشنهادهات:

با توجه به افزایش سویه های تولید کننده بتالاکتاماز در میان ایزوله های جدا شده از بیماران آزمایشگاه ها می توانند نقش عمده ای در شناسایی ارگانسیم های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف و اطلاع رسانی به پزشکان در پروسه تجویز دارو و درمان بیماران داشته باشند.

با توجه به فراوانی بالای ژن *bla_{OXA-1}* در میان ایزوله های انتروباکتر تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) بررسی سایر آنزیم های بتالاکتاماز از جمله VEB , PER توصیه میگردد.

Reference:

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology. United States. 25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010 ;Chapter 15, Page 219.
2. Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R and Arlet G. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 62 :133–136.
3. Muller S, Oesterlein A, Frosch M, Abele-Horn M, and Valenza G. Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases and qnr Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in German Isolates of *Enterobacter* Species. Microbial Drug Resistance. 2011;17(1):99-103.
4. Fernández A, José Pereira M, Manuel Suárez J, Poza M, Treviño M, Villalón P, Antonio Sáez-Nieto J, José Regueiro B. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(3):822-8.
5. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. curr pharm des journal. 1999;5(11):865-79.
6. Kim Y, Kim S, Young Lee J, Park Y, Young Lee K, and Won Kang M. Nosocomial Transmission of CTX-M-15 and OXA-30 Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Neurosurgical Intensive Care Unit. Annals of Clinical & Laboratory Science . 2005; 35(3):297-301.
7. Miro E, Segura C, Navarro F, Sorli L, Coll P, P. Horcajada J, Álvarez-Lerma F and Salvado M. Spread of plasmids containing the bla_{VIM-1} and bla_{CTX-M} genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010 ;65(4): 661-5.

8. http://www.who.int/mediacentre/multimedia/podcasts/2011/whd_20110408/en/
9. Grimont F, Grimont P. The Genus *Enterobacter*. Prokaryotes . 2006;6:197–214.
10. Brisse S, Grimont F, Grimont P. The Genus *Enterobacter*. Prokaryotes, 3th Edition.Springer. 2006;159-196.
11. Podschun R , Ullmann U, *klebsiella* spp. as nosocomial pathogens epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogeneicity factors.clin microbiol rev. 1988;11(4):589-603.
12. Hart, C. A. *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Serratia* spp .. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), 2nd ed, Principles and practice of Clinical Bacteriology. 2006; 377- 386.
13. Boriello SP, Murray PR, Funk G. *Citrobacter*, *E nterobacter*, *Klebsiella*, *Plesiomonas serratiaa* and other Enterobacteriaceae. Topley & Wilson .10 Edition.london,Hodder Arnold. 2005;1474-1506.
14. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Enterobacteriaceae. Textbook Of Diagnostic Microbiology, 4th edition. 2009; 452-455.
15. Conly, J. Antimicrobial resistance in Canada. Canadian Medical Association Journal. 2002; 167: 885-891.
16. Murray P. R , Baron E. J, Jorgensen J. H, Landry M. L, &. Pfaller M. A. 9th ed.Manual of Clinical microbiology. 2007; 649-669.
17. Hussain M , Alammam M. Molecular study of some virulence factors encoding genes of *enterobacter spp.* isolated from different clinical specimens. magazin of al-kufa university for biology . 2013; 5(2): 1-13.
18. Iversen, C, & Forsythe, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends in Food Science and Technology. 2003;14 (11): 443-454.

19. Boban N, Jerončić A, Punda-Polić V. Outbreak of nosocomial bacteremias, caused by *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter aerogenes*, in the neonatal intensive care unit, case - control study .S IGNA VITAE . 2011; 6(1): 27 - 32
20. Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella and enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin Respir Infect. 2002 Sep;17(3):215-30.
21. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphal R, Wagener MM, Miyashiro DK, Yu VL. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann Intern Med. 1991 Oct 15;115(8):585-90.
22. Hua Chen C, Chen Huang C. Risk factor analysis for extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in central Taiwan. BMC Infect Dis. 2013; 13: 417.
23. Antony B , Rajendra Prasad BPM. An outbreak of neonatal septicaemia by *Enterobacter cloacae*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2011;227-229.
24. Musil I, Jensen V, Schilling J, Ashdown B, Kent T. *Enterobacter cloacae* infection of an expanded polytetrafluoroethylene femoral-popliteal bypass graft: a case report. Journal of Medical Case Reports .2010; 4:131
25. BORNET C, DAVIN-REGLI A. Imipenem Resistance of *Enterobacter aerogenes* Mediated by Outer Membrane Permeability. Journal Of Clinical Microbiology. 2000; 38(3): 1048-1052.
26. Shaker Reyad, Osaili Tareq, Al-Omary Wail, Jaradat Ziad , Al-Zuby Mahmoud. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter sp.* from food and food production environments. 2007; 1241–1245.
27. Stock I, Wiedemann B. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. Clin Microbiol Infect. 2002 Sep;8(9):564-78.
28. Anna B. Bowen, Christopher R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. Emerging Infectious Diseases . 2006; 12 (8): 1185-1189.

29. Drudy D, Mullane N.R, Quinn T, Wall P. G, S Fanning. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. Clinical Infectious Diseases 2006; 42:996–1002.
30. Paauw A , Martien P. M. Caspers, Maurine A. Leverstein-van Hall, Frank H. J. Schuren, Roy C. Montijn, Jan Verhoef and Ad C. Fluit . Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. Microbiology. 2009;155:1478–1488.
31. Walker T, stuart. textbook of microbiology, 1th edition. 2008:107-117.
32. Bush K , Jacoby GA. Updated Functional Classification of B-Lactamases. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2010: 969–976.
33. Turner PJ. extended spectrum beta-lactamase. Clin Infect Dis. 2005;41supple 4:S273-5.
34. Fozen E, Charlier P, Toth M, Raquet X, Dubus A, et al.commenly used B-lactame resistance markers in molecular biology.Acta Cryst.1995;51:682-694.
35. Patricia A. Bradford .Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat.Clinical Microbiology Reviews .2001: 933–951.
36. Mark E. Rupp and Paul D .Extended Spectrum Lactamase(ESBL)-Producing Enterobacteriaceae. Drugs. 2003; 63 (4): 353-365.
37. Thirapanmethee k. Extended Spectrum β -Lactamases: Critical Tools of Bacterial Resistance. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science 2012; 39 (1), 1-8.
38. Szarecka A, R.Lesnock K, A.Ramirez-Mondragon C, B.Nicholas H, Wymore T. The Class D b-lactamase family: residues governing the maintenance and diversity of function. Protein Engineering, Design & Selection . 2011; 24 (10), 801–809.
39. Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. curr pharm des journal. 1999;5(11):865-79.
40. Poirel L , Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D B-Lactamases. Antimicrobial Agents And Chemotherapy.2010: 54(1), 24–38.

41. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005; 8:525–533.
42. Ana Fernandez A, Pereira MJ, Suarez JM , Poza M, Trevino M, Villalon P, Saez-Nieto JA, Regueiro BJ, Villanueva R, Bou G. Emergence in Spain of a Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Producing SFO-1 Extended-Spectrum B-Lactamase. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2011;49(3): 822–828.
43. Amin H, Zafar A, Ejaz H, Jameel N. Phenotypic characterization of ESBL produci *Enterobacter cloacae* among children. *Pakistan journal of medical sciences*. 2013; 29(1): 144–147.
44. Kang C, Kim S, Park W, Lee K, Kim KB, don Oh M, Kim E, Choe KW. Bloodstream Infections Caused by *Enterobacter* Species: Predictors of 30-Day Mortality Rate and Impact of Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance on Outcome. *clinical infectious disease*. 2004;39(6),818-818.
45. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; twenty first information supplement. *JAN* 2013;33(1):50-51.
46. Krishnamurthy V, Vijaykumar G.S, Sudeepa Kumar M, Prashanth H.V, Prakash R, Nagaraj E.R. Phenotypic and genotypics methods for detection of extended spectrum B-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Ventilator Associated Pneumonia.. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013 ;7(9): 1975-1978
47. Mark E. Rupp and Paul D. Fey. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Drugs*. 2003; 63 (4): 353-365.
48. BourouisA, Chihi H, Mahrouki S, AyariK, Ben MoussaM, Belhadj O. Molecular characterization of a transferable *bla*_{CTX-M-28} gene in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Microbiol Antimicrob*. 2013; 5(4): 38-43.

49. Rakotonirina H, Garin B, Randrianirina F, Richard V, Talarmin A and Arlet A. Molecular characterization of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Antananarivo, Madagascar. BMC Microbiology. 2013, 13:85.
50. Magoué Lonchel C, Meex C, Gangoué-Piéboji J, Boreux R , Okomo Assoumou M, Melin P and De Mol P. Proportion of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in community setting in Ngaoundere, Cameroon. BMC Infectious Diseases. 2012, 12:53.
51. Machado E, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Sousa JC, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the aac(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):3220-1.
52. Lorena C.C. Fehlberg, Albalucia M.C. Carvalho, Eloiza H. Campana, Paulo p. Gontijo-Filho, Ana C. Gales. Emergence of *Klebsiella pneumonia* producing KPC-2 carbapenemase in Paraba, Northeastern Brazil. braz j infect dis. 2012;16(6):577–580.
53. Toro M, Saenz Y, Cercenado E, Bezares B, Campello M, Undabeitia E, Torres C. Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospital. International Microbiology. (2011) ;14:173-181s.
54. Bhattacharjee A, Sen MR, Anupurba S, Prakash P, Nath G. Detection of OXA-2 group extended spectrum B-lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* from India. J Antimicrob Chemother. 2007 Sep;60(3):703-4.
55. Jouini A, Ben Slama K, Vinué L, Ruiz E, Saenz Y, Somalo S, Klibi N, Zarazaga M, Ben Moussa M, Boudabous A, Torres C. Detection of unrelated *Escherichia coli* strains harboring genes of CTX-M-15, OXA-1, and AAC(6')-Ib-cr enzymes in a Tunisian hospital and characterization of their integrons and virulence factors. Journal Of Chemotherapy. 2010 Oct;22(5):318-23.

56. Ruiz E, Rezusta A, Vinue L, Vindel A, Saenz Y, Monforte M.L, Estepa V, Ruiz-Larrea F, Revillo M.J, Torres C. Outbreak of *Klebsiella oxytoca* strains harbouring *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *qnrS1* and two copies of *aac*(6)-Ib-cr genes in a paediatric intensive care unit. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Helsinki, Finland, 16 - 19 May 2009.
57. Cubero M, Calatayud L, Tubau F, Josefina Ayats J, Peña C, Rogelio Martín R, Liñares J, Domínguez A, Ardanuy C. Clonal spread of *Klebsiella pneumonia* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital. *International Microbiology* (2013) 16:227-233.
58. Costa D, Poeta P, Sa'enz Y, Vinue' L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, and Torres C. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum *b*-lactamases of the CTX-M,TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.2006;58(6):1311-2.
59. Hanson ND, Thomson KS, Moland ES, Sanders CC, Berthold G, Penn RG. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.1999;44(3):377-80.
60. Asensio A, Alvarez-Espejo T, Fernandez-Crehuet J, Ramos J, Vaque-Rafart J, Bishopberger C, Hernndez Navarrete M, Calbo-Torrecillas F, Campayo J, Canton R . Trends in yearly prevalence of third generation cephalosporin and fluoroquinolone resistance enterobacteriaceae infections and antimicrobial use in Spanish hospital,spain,1999-2010. *Surveillance and outbreak reports*. 2011;1-10.
61. Sara E. Cosgrove, MD, MS; Keith S. Kaye, MD, MPH; George M. Eliopoulous, MD; Yehuda Carmeli, MD, MPH. Health and Economic Outcomes of the Emergence of Third-Generation Cephalosporin Resistance in *Enterobacter* Species. 2002;162:185-190.
62. Lenhard-Vidal A, Cardoso R, Andreia R. High prevalence rate of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) among Enterobacteriaceae in a small Brazilian public hospital. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;47(4).

63. Ferná'ndez A, Jose' Pereira M, Manuel Sua'rez J, Poza M, Trevi'ño M, Villalo'n P, Antonio Sa'ez-Nieto J, Jose' Regueiro B. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(3):822-8.
64. Song W, Lee KM, Kim HS, Kim JS, Kim J, Geong SH, et al. Clonal spread of both oxyimino-cephalosporin and cefoxitin-resistant *klebsiella pneumonia* isolates co-producing SHV-2a and DHA-1 beta-lactamase at a burns intensive care unit. *Int J Antimicrob Agent*. 2006;28:520-524.
65. Moland ES, Hong SG, Thomas KS, Larone DH, Hason ND. *klebsiella pneumonia* isolates producing at least eight different B-lactamase, including Ampc and KPC B-lactamase. *Antimicrob Agents chemoter*. 2007;51:800-1.
66. Rodriguez-Bano J, Pascual a. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamase. *Expert Rev Anti Infect ther*. 2008;6(5):671-83.
67. Keite da Silva Nogueiraa,b, Maria Cristina Paganinia, Andréia Contec, Laura Lúcia Cogoa, Iara Taborda de Messias Reasona,b, Márcio José da Silvad, Libera Maria Dalla-Costa. Article Emergence of extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacter spp.* in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Feb;32(2):87-92.
68. Wadekar MD, Anuradha K and Venkatesha D. Phenotypic detection of ESBL and MBL in clinical isolates of Enterobacteriaceae. *International Journal Of Current Research And Academic Review*. 2013;1(3):89-95.
69. Mordi RM, Hugbo PG. Frequency of Isolation of *Enterobacter* Species from a Variety of Clinical Specimens in a Teaching Hospital in Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* December 2011;10(6):793-800.

ضمیمه ۱:

❖ روش تهیه محیط مولر هینتون آگار (Muller-hinton aga) و کنترل

کیفی آن :

لیست مواد و لوازم مورد نیاز :

- پودر محیط MHA
- ترازو
- ارلن
- آب مقطر
- پلیت
- بشر استریل
- PH متر
- سرم فیزیولوژی استریل
- چسب اتوکلاو
- سوآپ استریل
- دیسک SXT
- سوش استاندارد انتروکوکوک فکالیس ATCC 29212-ATCC 33186

❖ روش تهیه محیط مولر هیتون آگار (MHA):

بر حسب مقدار محیط مورد نیاز، مقدار پودر و آب مقطر را با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده محیط محاسبه می‌کنیم. پودر را با ترازو وزن کرده در یک ارلن حاوی آب مقطر حل می‌نمائیم، سپس محیط را روی شعله حرارت می‌دهیم تا پودر کاملاً حل شده و رنگ محیط شفاف شود و بعد درب محیط کشت را کاملاً بسته و چسب اتوکلاو را روی سطح خارجی ارلن چسبانده سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو می‌کنیم.

پس از انجام اتوکلاو اجازه می‌دهیم تا دمای محیط کاهش یابد. سپس در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل اقدام به پخش محیط در پلیت‌ها می‌نمائیم. یکی از نکات مهم در حین پخش محیط قرار دادن پلیت‌ها روی سطح تراز و رعایت مقدار محیط ریخته شده در هر پلیت می‌باشد، به گونه ای که قطر محیط در هر پلیت 4mm باشد. زیرا در صورت افزایش با نتیجه مقاومت کاذب و با کاهش قطر با حساسیت کاذب مواجه خواهیم شد.

معمولاً در پلیت 15cm ، 60-70ml و در پلیت 10cm ، 25-30ml محیط ریخته شود.

کنترل کیفی محیط MHA از نظر آلودگی :

۵-۳ درصد از پلیت‌های حاوی محیط را در انکوباتور 35°C قرار داده و بعد از 24h از

نظر آلودگی (وجود کلونی روی محیط) بررسی می‌نمائیم .

کنترل کیفی MHA از نظر PH :

مقداری از محیط را در یک ارلن یا بشر استریل ریخته و آن را له می کنیم طوری که محیط ذوب شود سپس نوک الکتروود PH متر را در ارلن حاوی مولر مذاب قرار داده و بعد از بستن محیط اقدام به خواندن PH می نمائیم .

مقدار PH نرمال این محیط ۷/۲-۷/۴ می باشد .

کنترل کیفی محیط کشت از نظر رطوبت :

پس از خارج کردن محیط MHA از یخچال در صورت وجود قطرات آب روی سطح محیط یا روی درب پلیت باید پلیت را به مدت ۱۰-۳۰ دقیقه در انکوباتور 35°C قرار دهیم .

کنترل کیفی محیط MHA از نظر تیمین و تیمیدین :

محیط ساخته شده در صورتی قابل مصرف است که میزان تیمین و تیمیدین آن کم باشد در غیر این صورت باعث مقاومت کاذب به سولفونامید و تری متوپریم خواهد شد. به همین دلیل جهت کنترل کیفی این محیط از دیسک کوتریموکسازول (Sxt) و دو سویه استاندارد انتروکوک فکالیس ATCC 29212 و ATCC33186 استفاده می شود .

❖ روش کار :

مقداری از کلونی انتروکوک فکاليس ATCC 29212 یا ۳۳۱۸۶ را در TSB یا سرم فیزیولوژی استاندارد حل کرده و سوسپانسیونی با کدورت معادل محیط 0/5 مک فارلند تهیه می نمائیم . سپس با استفاده از سوآپ استریل مقداری از سوسپانسیون را روی محیط MHA برده و در سه جهت با زاویه ۴۵ درجه کشت می دهیم و بعد ۱۵-۱۰ دقیقه که سوسپانسیون روی محیط جذب شد دیسک Sxt در وسط پلیت قرار می دهیم . پلیت را در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کرده و بعد از 24h اقدام به اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک می نمائیم . در صورتی که قطر هاله عدم رشد مساوی یا بزرگتر از 20mm باشد محیط از کنترل کیفی مناسبی برخوردار می باشد .

ضمیمه ۲

❖ روش استاندارد تهیه محیط ۰/۵ مک فارلند :

- ۱/۱۷ گرم پودر کلرور باریم را به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید.
- ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک را به ۹۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید تا اسید سولفوریک ۱٪ ایجاد شود.
- ۰/۵ میلی لیتر از محلول اسید سولفوریک ۱٪ را دور بریزید و ۰/۵ میلی لیتر از محلول کلرور باریم را جایگزین آن نمایید.
- این محلول در طول موج ۶۲۵ نانومتر باید دارای جذب نوری ۰/۰۸ - ۰/۰۱۳ باشد.
- این محلول را به میزان ۵ ml در لوله درپیش دارتقسیم شده و در دمای اتاق، دور از نور نگهداری می شود.

ضمیمه ۳

❖ روش تهیه (Tris -Boric acid – EDTA)TBE 10x buffer

مواد لازم:

- تریس
- اسید بوریک
- EDTA ۰/۵ مولار
- آب مقطر استریل

۵۴ گرم تریس و ۲۷/۵ گرم اسید بوریک را در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده و سپس

۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار را به آن اضافه کرده و با آب مقطر حجم محلول را به یک لیتر می

رسانیم.

ضمیمه ۴

روش تهیه (Tris -Boric acid – EDTA)TBE 1x buffer

برای تهیه بافر 1X، بافر 10X را به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق می نمایم.